

**Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums -
Analytische Bestimmung im Haar und in Hautoberflächenlipiden
mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und
Gaschromatographie-Massenspektrometrie**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Volker Auwärter

geboren am 27. Mai 1970 in Bad Wimpfen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Fritz Pragst
 2. Prof. Dr. rer. nat. Michael W. Linscheid
 3. Prof. Dr. rer. nat. Rolf Aderjan

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2006

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	3
2.1 Alkoholmarker	3
2.1.1 Alkoholmarker im Blut	4
2.1.1.1 Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT)	4
2.1.1.2 Erhöhte Leberenzymaktivitäten (GGT, GOT/ASAT, GPT/ALAT)	5
2.1.1.3 Das mittlere korpuskulare Erythrozytenvolumen (MCV)	5
2.1.2 Mögliche Alkoholmarker im Haar	6
2.1.3 Ethylglucuronid (EtG)	7
2.1.4 Fettsäureethylester (FSEE)	9
2.2 Grundlagen der Haaranalytik	20
2.2.1 Aufbau und Struktur des Haares	20
2.2.2 Die Wachstumsphasen der Haare	24
2.2.3 Physiologie der Sebumproduktion	25
2.2.4 Einlagerung von Substanzen ins Haar	26
2.3 Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)	28
2.3.1 Funktionsprinzip und Aufbau der HS-SPME	29
2.3.2 Physikalische Grundlagen	32
2.3.3 Experimentelle Parameter	34
2.3.4 Anwendungsgebiete für HS-SPME	38
2.4 GC-MS und HPLC-DAD	38
3 EXPERIMENTELLER TEIL	39
3.1 Geräte	39
3.1.1 HS-SPME und GC-MS	39
3.1.2 HPLC-DAD	40
3.1.3 Geräte zur Probenvorbereitung	40
3.2 Chemikalien und Standardsubstanzen	41
3.2.1 Verwendete Chemikalien	41
3.2.2 Fettsäuren	41
3.2.3 Synthese und Reinheitsprüfung der FSEE und D ₅ -FSEE	41
3.2.4 Herstellung des Phosphatpuffers pH 7,6 nach Sørensen	44
3.2.5 Herstellung der Harnstoff/Mercaptoacetat-Lösung	44

3.3 Probengewinnung und Asservierung	44
3.3.1 Haarproben	44
3.3.2 Wischproben	45
3.3.3 Pflasterproben	46
3.4 Probenvorbereitungs- und Analysenmethoden	46
3.4.1 Haare auf FSEE und Squalen	47
3.4.2 Wischproben	48
3.4.3 Pflasterproben	48
3.4.4 HS-SPME/GC-MS-Methode	49
3.4.4.1 HS-SPME	49
3.4.4.2 GC-MS	49
3.4.5 HPLC-DAD-Methode	50
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
4.1 Entwicklung der analytischen Verfahren	51
4.1.1 Vorbehandlung und Lagerung der Haarproben	51
4.1.1.1 Waschen und äußerliches Entfetten der Haarproben	52
4.1.1.2 Lagerung der Haarproben	52
4.1.2 Extraktion der FSEE aus dem Haar	53
4.1.3 Erstellung und Optimierung der HS-SPME-Methode	58
4.1.3.1 Zusammensetzung der Probenflüssigkeit	58
4.1.3.2 Optimierung der Extraktionstemperatur	60
4.1.3.3 Optimierung der Extraktionsdauer	61
4.1.3.4 Auswahl des Faserbeschichtungsmaterials	62
4.1.3.5 Einfluss der Desorptionsdauer	63
4.1.3.6 Einfluss der Probenmenge auf die HS-SPME-Extraktionsausbeute	63
4.1.4 Entwicklung der GC-MS-Methode zur FSEE-Bestimmung	65
4.1.5 Entwicklung des analytischen Verfahrens zur Squalenbestimmung	76
4.1.6 Kalibration und Validierung der Methoden	80
4.1.6.1 Bestimmung der FSEE-Konzentrationen mittels HS-SPME/GC-MS	80
4.1.6.2 Bestimmung des Squalengehalts mittels HPLC-DAD	82
4.2 Untersuchungen zum Einlagerungsmechanismus der FSEE ins Haar	83
4.2.1 Segmentweise Haaruntersuchungen auf FSEE	85
4.2.2 Squalenkonzentrationen im Haar	92
4.2.3 Untersuchungen von Pflaster- und Wischtests	92

4.3 Einflussgrößen auf die FSEE-Konzentrationen im Haar	93
4.3.1 Trinkverhalten	93
4.3.2 Haarkosmetische Behandlungen	95
4.3.2.1 Tönung	95
4.3.2.2 Intensivtönung (Coloration)	96
4.3.2.3 Färbung	96
4.3.2.4 Blondieren/Bleichen	97
4.3.2.5 Dauerwelle	98
4.3.2.6 Haarwachs	99
4.3.2.7 Haarwäsche	101
4.3.2.8 Ethanolhaltige Haarkosmetika	102
4.3.2.9 Direkter Eintrag von FSEE aus handelsüblichen Haarpflegeprodukten	105
4.3.3 Untersuchung alternativer Haarsorten	105
4.3.3.1 Schamhaare	106
4.3.3.2 Achselhaare	109
4.3.3.3 Barthaare	110
4.3.3.4 Andere Körperbehaarung	110
4.3.4 Sebumproduktion und Aufnahmekapazität des Haars	111
4.4 Relative c_{i-FSEE} mit Squalen als natürlicher Bezugssubstanz	111
4.5 Vergleich von EtG- und FSEE-Konzentrationen im Haar	123
4.6 Erprobung in der Praxis	126
4.6.1 Vergleich von c_{i-FSEE} im Haar mit anderen Alkoholmarkern	126
4.6.2 Fahreignungsprüfungen und Gerichtsfälle	128
4.6.3 Untersuchung von Haarproben auf Drogen und FSEE	130
4.6.4 Vergleich von c_{i-FSEE} und c_{EtG} im Haar mit Blutparametern	130
4.7 Relative FSEE-Konzentrationen in Hautoberflächenlipiden	134
4.7.1 Wischtest auf FSEE	134
4.7.2 Pflastertest auf FSEE	142
5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	144
6 ZUSAMMENFASSUNG	146
7 LITERATURVERZEICHNIS	150
8 ANHANG Massenspektren von Fettsäureethylestern und deren D_5-Derivaten	163

Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-OH-Indolylelessigsäure	GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
5-HTOL	5-OH-Tryptophol	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ACN	Acetonitril	HS	Headspace (Dampfraum)
ADH	Alkoholdehydrogenase	HS-SPME	Headspace-Solid Phase Microextraction
AEAT	Coenzym-A-Ethanol-O-Acyl-Transferase	i-FSEE	Interne FSEE (aus dem Haar extrahierte FSEE)
ALAT	Alanin-Amino-Transferase	KG	Körpergewicht
ALDH	Aldehyddehydrogenase	LC	Liquid Chromatography
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase	LDL	Low-Density-Lipoprotein
BAK	Blutalkoholkonzentration	LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
BtmG	Betäubungsmittelgesetz	LOQ	Limit of Quantitation (Bestimmungsgrenze)
C14	Myristinsäure	MCV	Mittleres korpuskulares Erythrozytenvolumen
C16	Palmitinsäure	MEOS	Mikrosomales Ethanol oxidierendes System
C18	Stearinsäure	MG	Molgewicht
C18 Δ^9	Ölsäure	MS	Massenspektrometrie
CDT	Carbohydrate-Deficient Transferrin	MSD	Massenselektiver Detektor
CI	Chemische Ionisation	m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
CoA	Coenzym A	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
CW	Carbowax®	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DAD	Diodenarraydetektor	ODS	Octadecylsilan
DIN	Deutsches Institut für Normung	PA	Polyacrylat
DMSO	Dimethylsulfoxid	PDMS	Polydimethylsiloxan
DVB	Divinylbenzol	PTFE	Polytetrafluorethylen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	R _t	Retentionszeit
e-FSEE	Externe FSEE (von der Haaroberfläche gelöste FSEE)	SIM	Selected Ion Monitoring
EI	Elektronenstoßionisation	SPE	Solid Phase Extraction
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	SPME	Solid Phase Microextraction
-Et	-Ethylester	t _{1/2}	Halbwertszeit
EtG	Ethylglucuronid	THC	Tetrahydrocannabinol
EtOH	Ethanol	TPR	Templated Resin
FS	Fettsäure	UV	Ultraviolett(er Teil des elektromagnetischen Spektrums)
FSEE	Fettsäureethylester	ZNS	Zentrales Nervensystem
GGT	Gamma-Glutamyl-Transpeptidase		
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase		
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase		
GSH	Glutathionsulfhydryl		

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Pragst ganz herzlich dafür danken, dass ich meine Promotionsarbeit am Institut für Rechtsmedizin der Charité unter seiner hervorragenden fachlichen Betreuung durchführen konnte.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Charité, auch über die Abteilung Toxikologische Chemie hinaus, die in kollegialer Zusammenarbeit dazu beigetragen haben, diese Arbeit erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Besonderer Dank geht in dieser Beziehung an Herrn Dr. Hartwig.

Danken möchte ich auch meinen Eltern für die Unterstützung meines Chemiestudiums, meiner Frau und meinen Kindern für die Geduld und den beiden ehemaligen Kollegen Dr. Matthias Herzler und Dr. Frank Sporkert für die schöne Zeit, die ich mit ihnen im Institut verbringen durfte. Dank auch an Careen Merckel und Regina Boche, die bis zum Abschluss meiner Arbeit für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Alkoholmissbrauch und seine gesundheitlichen und sozialen Folgen stellen seit jeher ein großes gesellschaftliches Problem dar. Alkohol rangiert unter den missbrauchten Substanzen in Bezug auf seine volkswirtschaftliche Schädlichkeit unangefochten an erster Stelle. Da es sich bei Alkoholmissbrauch und Alkoholismus um sehr komplexe Phänomene handelt und die Grenzen zum normalen Trinken fließend sind, bereitet oftmals bereits die Diagnosestellung erhebliche Probleme. Bei bekannter Alkoholabhängigkeit ist häufig die Einordnung mittels diagnostischer Kriterien in eine bestimmte Trinkerkategorie nach Menge, Trinkmuster und Trinkfrequenz gefragt. Außer eingehenden Patientengesprächen, die nach psychologisch diagnostischen Kriterien ausgewertet werden, können hier auch biologische Marker von großem Nutzen sein. Bezüglich des Trinkverhaltens kann die Bevölkerung in Abstinenzler (< 1 g Ethanol/Tag, in Deutschland 17-23 %), schwache Trinker (1-10 g Ethanol/Tag, ca. 40 %), sog. Normaltrinker („Social Drinkers“, 11-60 g Ethanol/Tag, ca. 32-38 %) sowie exzessive Alkoholkonsumenten und Alkoholiker (> 60 g Ethanol/Tag, 4-5 %) unterteilt werden. Bei Letzteren ist der tägliche Konsum von mehr als 400 g Ethanol/Tag keine Seltenheit. Vor diesem Hintergrund und angesichts der gravierenden akuten und chronischen Wirkungen sowie des Potentials der Erzeugung starker psychischer und physischer Abhängigkeit gehört Ethanol zu den in jeder Hinsicht am intensivsten untersuchten toxischen Verbindungen. Während der Nachweis der akuten alkoholischen Beeinflussung durch Bestimmung der Blutalkoholkonzentration kein Problem darstellt, gibt es für die Prüfung auf chronisch exzessiven Alkoholkonsum trotz jahrzehntelanger Bemühungen und zahlreicher Ansätze bislang keine wirklich befriedigende Lösung. Der Stand der Forschung zu Labormarkern des Alkoholmissbrauchs und die Erfahrungen bei deren praktischer Anwendung wurden in Übersichten mehrfach zusammengefasst [1-3]. Bisher verwendete Marker missbräuchlichen Alkoholkonsums im Blut umfassen Parameter wie Leberenzymaktivitäten (GGT, GOT und GPT), das kohlenhydratdefiziente Transferrin (CDT), das mittlere korpuskulare Erythrozytenvolumen (MCV) und den Nachweis erhöhter Methanol-, Aceton- oder Isopropanol-Blutkonzentrationen [1,4]. Ein Problem des eindeutigen Nachweises von chronischem Alkoholmissbrauch ist durch mangelnde Spezifität und/oder Sensitivität der einzelnen Parameter gegeben. So können z. B. erhöhte Leberwerte auch bei einer Fülle anderer Erkrankungen oder Intoxikationen auftreten, bei CDT wurde u. a. die mangelnde Standardisierung und eine zu geringe Sensitivität kritisiert [1]. Die Anwendung der Haaranalyse zu diesem Zweck wurde hingegen

erst in den letzten Jahren näher untersucht und bietet prinzipiell den Vorteil eines im Vergleich zu Blutuntersuchungen vergrößerten diagnostischen Zeitfensters und der potentiellen Anwesenheit direkter Alkoholmarker, die im Gegensatz zu indirekten Markern noch beide Kohlenstoffatome des Ethanols tragen. Es liegen einige Arbeiten zu Ethylglucuronid (EtG) vor [5-8], die eine Eignung dieser Substanz als Alkoholmissbrauchsmarker im Haar nahe legen. In den dieser Dissertation vorausgegangenen Untersuchungen [9] wurden erste Ansätze zur Verwendung von Fettssäureethylestern (FSEE) im Haar als Marker missbräuchlichen Alkoholkonsums gemacht, die in der vorliegenden Arbeit vertieft werden sollten. Dabei sollten insbesondere die weitere Optimierung des analytischen Verfahrens und die Aufklärung des Einlagerungsmechanismus im Mittelpunkt stehen. Zudem sollten die unterschiedlichen Einflussgrößen auf die FSEE-Konzentrationen untersucht und eine praktische Erprobung der Methode an einer großen Zahl von Probanden mit bekanntem und dokumentiertem Trinkverhalten durchgeführt werden.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 Alkoholmarker

In diesem Abschnitt soll zunächst auf Alkoholismusmarker eingegangen werden, die bereits in der Diagnostik zur Anwendung kommen. In den folgenden Kapiteln wird ein kurzer Überblick über mögliche Marker im Haar unter besonderer Berücksichtigung von Ethylglucuronid und Fettsäureethylestern gegeben.

Die Hauptwege des Alkoholabbaus, die Dehydrierung bzw. Oxidation zu Acetaldehyd mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase (ADH), des mikrosomalen Ethanol oxidierenden Systems (MEOS) oder der Katalase, die weitere Umwandlung mit Hilfe der Aldehyddehydrogenase (ALDH) zum Acetat und dessen Abbau im Rahmen des Citratzyklus sind seit vielen Jahren gut bekannt und in jeder Hinsicht gründlich untersucht [10]. Daneben gibt es aber einige nichtoxidative Seitenwege des Alkoholstoffwechsels, die zwar für den Gesamtumsatz unwesentlich sind, die jedoch aus diagnostischer und teilweise auch toxikologischer Sicht von erheblichem Interesse sein können. Neben diesen Alkoholmetaboliten kommen als potentielle Alkoholmarker aber auch alle messbaren physiologischen Parameter in Betracht, die im Zusammenhang mit exzessivem Alkoholkonsum typische Veränderungen zeigen.

Labormarker für missbräuchlichen Alkoholkonsum können in folgende Kategorien eingeteilt werden [1,11,12]:

State-Marker:	Zustandsmarker; biochemische Indikatoren, die bei exzessivem Alkoholkonsum charakteristische Werte annehmen <i>z. B. CDT, GGT und andere Leberenzymaktivitäten, MCV, Ethanol (BAK)</i>
Trait-Marker:	Vererbare Indikatoren für die Disposition zur Alkoholabhängigkeit <i>z. B. Aktivitäten von Adenylatcyclase oder Monoaminoxidase in Blutplättchen</i>
Kurzzeitmarker:	Bereits wenige Tage nach Abstinenzbeginn negativ <i>z. B. Ethanol (BAK), Methanol, Acetat; Ethylglucuronid, Fettsäureethylester, Verhältnis 5-OH-Tryptophol (5-HTOL) / 5-OH-Indolylsigsäure (5-HIAA) im Blut</i>
Langzeitmarker:	Mehrere Wochen oder Monate nach Abstinenzbeginn noch positiv <i>z. B. CDT, GGT und andere Leberenzymaktivitäten, MCV</i>

- Direkte Marker: Enthalten die Kohlenstoffatome des Ethanols
 z. B. Ethanol, Ethylglucuronid, Fettsäureethylester, Phosphatidyl-ethanol, Acetaldehyd-Hämoglobin-Addukte
- Indirekte Marker: Basieren auf pathologischen Veränderungen des Metabolismus und der Biochemie bei exzessivem Alkoholkonsum
 z. B. CDT, GGT, MCV, Verhältnis 5-HTOL/5-HIAA

Welcher Marker aus welcher Kategorie in der Praxis gewählt wird, hängt naturgemäß von der zugrunde liegenden Fragestellung ab. Für forensische Fragestellungen gilt das Interesse meist nur den State-Markern. Soll z. B. eine Beeinflussung durch Alkohol im Straßenverkehr oder zum Zeitpunkt einer Straftat nachgewiesen werden, so wird in der Regel die Bestimmung der Blutalkoholkonzentration (BAK) herangezogen. Langzeitmarker sind dagegen von Interesse, wenn beispielsweise zur Klärung der Fahreignung auf chronisch exzessiven Alkoholkonsum geprüft werden soll. Generell sind direkte Marker den indirekten vorzuziehen, da sie nicht denselben Einschränkungen bezüglich mangelnder Spezifität durch falsch positive Befunde unterliegen.

Bei den Untersuchungen muss stets die Verhältnismäßigkeit bezüglich entstehender Untersuchungskosten gewahrt bleiben, ohne dass die Aussagesicherheit zu gering werden darf.

2.1.1 Alkoholmarker im Blut

Hier soll nur auf die wichtigsten klinisch-chemischen Parameter, die momentan bei der Diagnose des chronischen Alkoholmissbrauchs Verwendung finden, eingegangen werden. Es handelt sich hierbei um indirekte Langzeitmarker.

2.1.1.1 Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT)

Das Transferrin ist ein Glykoprotein des Plasmas ($M \approx 80.000$), das in der Leber synthetisiert wird und für Bindung und Transport von Eisen durch die Zellmembran verantwortlich ist. An bis zu acht Stellen im Molekül kann das Transferrin Sialinsäurereste tragen, deren Anlagerung durch die Glykosyltransferase katalysiert wird. Bei übermäßigem Alkoholkonsum kann es zu einer Hemmung dieses Enzyms und/oder einer Verringerung der Anzahl an Bindungsstellen kommen, in deren Folge der Sialinsäuregehalt des Transferrins reduziert wird. Dabei wird als „kohlenhydratverarmtes“ Transferrin (CDT) derjenige

Anteil der Isoformen, die weniger als drei Sialinsäurereste tragen, betrachtet. Die Konzentrationsangabe erfolgt in U/l, gleichbedeutend mit der Konzentration an Asialo-, Mono-sialo- und Disialotransferrin in mg/l, in % CDT bezogen auf das Gesamttransferrin oder seltener in % Disialotransferrin bezogen auf Tetrasialotransferrin. Bei Heranziehen eines Schwellenwerts von 18-20 U/l für Männer und 26-28 U/l für Frauen wird bei einer Spezifität von 90-100 % eine Sensitivität von 80 % für Alkoholiker (im Risikobereich 60 %) erreicht. Die Halbwertszeit beträgt ca. 14 Tage [1,13].

2.1.1.2 Erhöhte Leberenzymaktivitäten (GGT, GOT/ASAT, GPT/ALAT)

Generell können erhöhte Leberenzymaktivitäten Ausdruck einer Leberzellschädigung sein. Wird die Membran der Leberzellen durch entzündliche Prozesse für größere Moleküle durchlässig, so führt das zu einem Anstieg aller Leberenzymaktivitäten im Blut. Dabei kann nicht ohne weiteres erkannt werden, welche Ursachen dieser Leberzellschädigung zugrunde liegen. Außer einer Schädigung des Gewebes durch chronischen Alkoholmissbrauch kommen hier auch Hepatitisinfektionen oder andere Lebererkrankungen infrage. Im Zusammenhang mit chronisch exzessivem Alkoholkonsum tritt jedoch häufig eine isolierte Erhöhung des GGT-Wertes auf, der als Folge einer Enzyminduktion in der Leber zu deuten ist und dann eine Spezifität von ungefähr 80 % bei einer Sensitivität von 30-90 % aufweist. Die Halbwertszeit beträgt bei gesunder Leber ca. 26 Tage [1].

2.1.1.3 Das mittlere korpuskulare Erythrozytenvolumen (MCV)

Nach chronischem Alkoholmissbrauch ist mit einer Sensitivität von 25-95 % eine Erhöhung des MCV über 98 fl festzustellen [1]. Diese Makrozytose wird durch eine alkoholtoxische Knochenmarkschädigung, möglicherweise in Verbindung mit einem durch übermäßigen Alkoholkonsum bedingten Folsäuremangel, hervorgerufen. Aufgrund der Halbwertszeit der Erythrozyten von ca. 100 Tagen dauert es mehrere Monate, bis sich die Werte nach Abstinenzbeginn wieder normalisiert haben. Die Spezifität dieses Markers ist verglichen mit GGT und CDT deutlich geringer, da auch eine Vielzahl anderer Erkrankungen oder z. B. übermäßiges Rauchen zu einer Erhöhung des MCV führen können.

2.1.2 Mögliche Alkoholmarker im Haar

Aus den bisherigen umfangreichen Erfahrungen mit der Haaranalyse lassen sich folgende allgemeine Anforderungen an einen durch Haaranalyse erfassbaren Alkoholismusmarker stellen:

- Es muss sich entweder um hinreichend stabile, die Ethylgruppe des Ethanols tragende Metaboliten von Stoffen handeln, die im gesunden menschlichen Stoffwechsel in analytisch messbaren Konzentrationen ständig präsent sind (direkte Ethanol-Marker), oder um eindeutige Produkte des durch starken Alkoholkonsum pathologisch veränderten Stoffwechsels (indirekte Marker). Bei gelegentlichem Alkoholkonsum sollte im Vergleich zum Alkoholabusus bei den direkten Ethanolmarkern der Einbau der ethanolischen Ethylgruppe in die endogene Ausgangssubstanz nur in relativ geringem Umfang oder gar nicht stattfinden. Die indirekten Marker sollten eine hohe Spezifität aufweisen, d. h. die pathologischen Veränderungen des Stoffwechsels sollten nach Möglichkeit nicht auch von anderen Krankheiten hervorgerufen werden können.
- Ein geeigneter Marker muss in ausreichender Konzentration durch den Blutkreislauf zur kapillar durchbluteten Haarpapille transportiert werden und sich dort in die wachsende Haarstruktur einlagern. Dabei zeigte sich in bisher durchgeführten Arbeiten, dass auf diesem Wege neben organischen Basen wie den meisten illegalen Drogen auch lipophile, membrangängige Substanzen kleiner Molekülgröße effektiv eingebaut werden können [14,15]. Auch die Einlagerung von Substanzen, die in Schweiß oder Sebum vorhanden sind und nach Abschluss des Haarbildungsprozesses in die Haar-matrix eindiffundieren und dort gespeichert werden, ist möglich.
- Im Rahmen einer Haaranalyse müssen diese Substanzen durch Anwendung eines geeigneten Extraktionsverfahrens unzersetzt aus dem Haar extrahiert werden und mittels analytischer Messmethoden qualitativ und quantitativ eindeutig bestimmt werden können.

Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen kommen grundsätzlich sowohl freies als auch durch alkalische Hydrolyse freigesetztes Ethanol [9], Phosphatidylethanol [16-20], Cocaethylen [21-24], durch Acetaldehyd modifizierte Haarproteine [25-30], Tetrahydroisochinoline und β -Carboline [31] oder auch indirekte Alkoholmarker wie das Verhältnis 5-HTOL/5-HIAA [32-35], Dolichol [36-38] oder die Kupferionen-Konzentration [39], insbesondere aber Ethylglucuronid und Fettsäureethylester infrage. Ein ausführlicher

Überblick über diese potentiellen Alkoholmarker im Haar wird von Pragst et al. gegeben [9], der aktuelle Stand der Forschung wird in einem Buchbeitrag ausführlich beschrieben [40]. Im Folgenden soll daher nur auf Ethylglucuronid und Fettsäureethylester als Alkoholmarker eingegangen werden, die das größte Potential im Hinblick auf einen erfolgreichen Einsatz als Alkoholmarker im Haar besitzen.

2.1.3 Ethylglucuronid (EtG)

Diesem Nebenmetaboliten des Ethanols wird zurzeit neben den Fettsäureethylestern die größte Bedeutung als Alkoholmarker im Haar zugemessen. Einige Daten und die Struktur des Moleküls sind in Abb. 1 dargestellt.

Die Bildung dieses extrem hydrophilen und schwerflüchtigen Phase II-Metaboliten des Ethanols durch Reaktion von Ethanol mit aktivierter Glucuronsäure macht ca. 0,5 % der gesamten Ethanolelimination aus. EtG wurde 1952 von Kamil et al. als Triacetylmethylester aus Kaninchenharn isoliert [41], 1967 bzw. 1973 wurde es in menschlichem Urin nachgewiesen [42,43]. Von Schmitt et al. wurde 1995 erstmals eine GC-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung im Blut und Urin vorgestellt [44]. Auch eine LC-MS-Methode wurde beschrieben [45], zudem wurde ein Immunoassay, der auf EtG anspricht, entwickelt [46]. In der Literatur wurden EtG-Werte zwischen 0,1 und 20 µg/ml im Serum [47] und 1 bis 1240 µg/ml im Urin gemessen [44,48,49]. Die terminale Halbwertszeit der Elimination wurde zu 2-3 h bestimmt [47], eine spätere Arbeit ergab eine exponentielle Eliminationskonstante von $3,0 \pm 1,45 \text{ h}^{-1}$ [50].

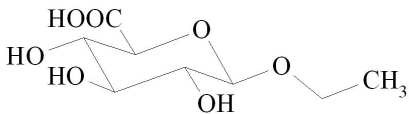
 <p><i>Ethylglucuronid</i></p>	Bildung:	Konjugation von Ethanol mit UDP-Glucuronsäure
	$t_{1/2}$ in Serum:	2 – 3 h
	Konzentrationen bei Alkoholikern:	Serum: 1 – 20 µg/ml Urin: 0 – 130 µg/ml
	Konzentrationen in Haaren [8]:	„Normaltrinker“: < 30 pg/mg Alkoholiker: 50 pg/mg – 13 ng/mg

Abb. 1: Struktur und pharmakokinetische Eigenschaften von Ethylglucuronid.

EtG ist als Kurzzeit-Marker im Blut oder Urin für Alkoholkonsum aus zwei Gründen von Bedeutung: Erstens kann mit seiner Hilfe der Verdacht einer Kontamination von Blutproben mit Ethanol bei oder nach der Entnahme überprüft werden [51]. Liegt eine Kontamination vor, so ist kein EtG nachweisbar. Zweitens kann das Zeitfenster zum Nachweis einer alkoholischen Beeinflussung auf bis zu 80 Stunden verlängert werden. Unter Verwendung eines kinetischen Modells und Durchführung entsprechender Berechnungen kann aus gemessenen EtG-Konzentrationen eine Überprüfung von Trinkangaben stattfinden [50].

Im Jahre 1993 wurde der Nachweis von EtG im Haar erstmals beschrieben [52]. Untersuchungen zur Bestimmung von EtG und erste Vergleiche der Ergebnisse mit dem Trinkverhalten der Probanden wurden zwischen 1995 und 2004 von verschiedenen Autoren durchgeführt [5-8,53-56].

In den ersten Arbeiten [5,52,53] wurden EtG-Haarkonzentrationen angegeben, die sich nachträglich als zu hoch erwiesen. Nachdem inzwischen methodische Verbesserungen eingeführt wurden, besteht aber ein relativ klarer Eindruck über die Haarkonzentrationen von EtG und ihren Zusammenhang mit dem Trinkverhalten. Am Beispiel der von Janda et al. untersuchten 97 Proben (Abb. 2) soll das kurz verdeutlicht werden [8].

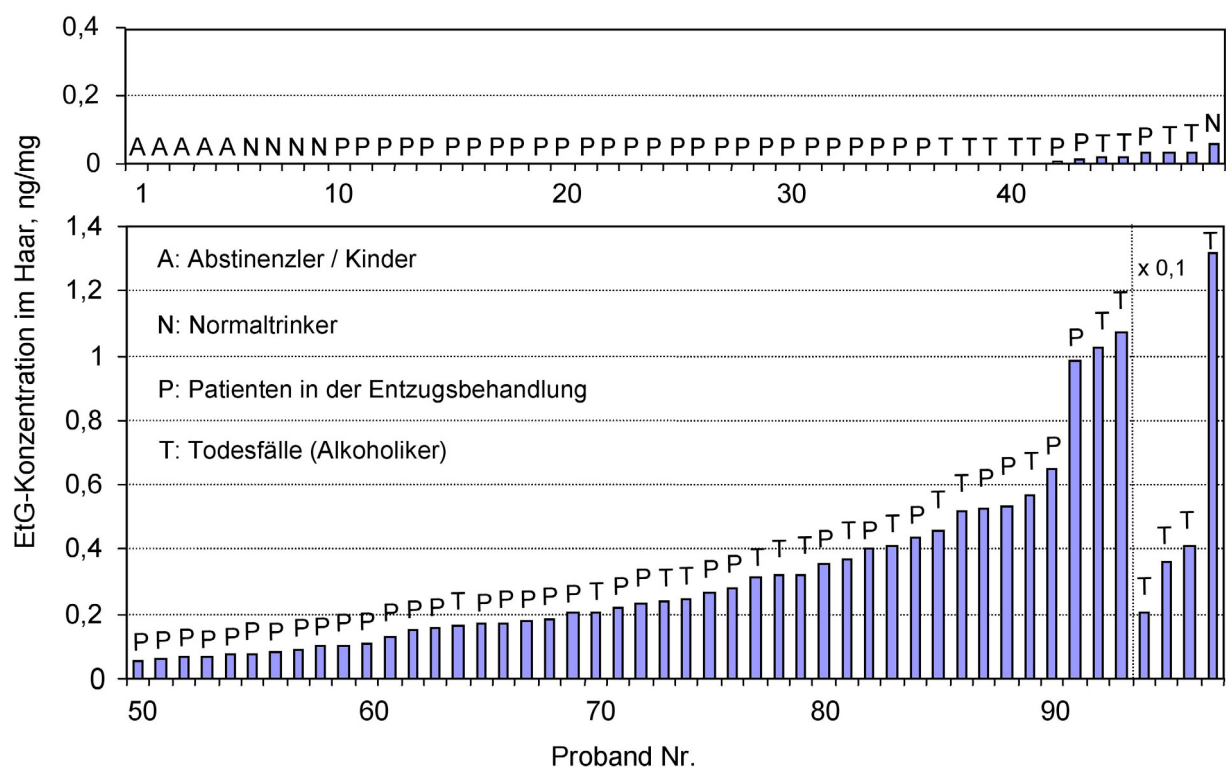


Abb. 2: EtG-Konzentrationen im Haar nach Janda et al., aus [40].

Alle Proben von Abstinenzlern (A) und Normaltrinkern (N) bis ca. 30 g Ethanol/Tag lieferten bei einer Nachweisgrenze um 0,03 ng/mg negative Ergebnisse. Der einzige Normaltrinker, bei dem EtG im Haar nachgewiesen werden konnte, machte möglicherweise zu niedrige Trinkangaben. Für die Gruppe der Patienten in der Entzugsbehandlung fällt die Analyse zu etwa der Hälfte negativ aus, bei der Hälfte mit positivem EtG-Nachweis bleiben die Werte unter 1 ng/mg. Bei den Todesfällen mit bekanntem Alkoholabusus wurden die höchsten Konzentrationen gefunden, allerdings fiel die Messung in 5 von 27 untersuchten Fällen negativ aus. Daraus folgt, dass ein positiver Nachweis von EtG im Haar mit relativ hoher Sicherheit einen chronisch exzessiven Alkoholkonsum beweist, während ein negatives Ergebnis diesen nicht sicher ausschließt.

Der Einlagerungsmechanismus von EtG ins Haar wurde bisher nicht näher untersucht. Da EtG eine hydrophile Carbonsäure ist, die bei physiologischem pH in dissoziierter Form vorliegt, kann man davon ausgehen, dass die Tendenz zur Einlagerung in den Basalzellen der Haarwurzel eher gering ist. Als alternativer Einlagerungsweg kommt die Diffusion des EtG aus dem Schweiß in das Haar in Betracht. Als Folge wäre eine zeitaufgelöste Interpretation der Analysenergebnisse bei segmentweiser Untersuchung einer Haarprobe nicht möglich. Ein Vorteil von EtG, das fast ausschließlich in der Leber gebildet wird, liegt in der fehlenden Möglichkeit eines durch äußere Kontamination bedingten falsch positiven Ergebnisses.

Insgesamt ist die Haaranalyse auf EtG als sinnvolle Hilfe bei der retrospektiven Aufklärung des Alkoholkonsums einzuschätzen, die bei einer weiteren Senkung der Nachweisgrenze durch methodische Verbesserungen noch an Wert gewinnen kann.

2.1.4 Fettsäureethylester (FSEE)

Auf diese direkten Alkoholmarker, die im Jahre 2000 erstmals im Haar nachgewiesen wurden [9], soll hier ausführlich eingegangen werden.

Die enzymatische Bildung von FSEE nach Alkoholkonsum wurde von Lange et al. 1981 erstmals beschrieben [57] und später von verschiedenen Forschungsgruppen an Zellhomogenisaten, im Tierversuch oder auch am Menschen ausführlich untersucht. Der jeweilige Stand der Erkenntnisse zu den FSEE wurde seit ihrem erstmaligen Nachweis in zahlreichen Reviews und Mitteilungen zusammengefasst [58-68].

Tabelle 1: Literaturangaben über Bildung, Elimination und Konzentrationen von Fettsäureethylestern in menschlichen Körperflüssigkeiten und Geweben sowie pathogene Wirkungen von Fettsäureethylestern. Zitate siehe auch im Text.

Enzyme mit FSEE-Synthaseaktivität

- Zytosolische FSEE-Synthase
 - Mikrosomale FSEE-Synthase
 - Carboxylesterase
 - Lipoproteinlipase
 - Carboxylesterlipase
 - Cholesterolesterase
-

FSEE-Synthase wurde nachgewiesen in

- Leber, Pankreas, Myocard, Fettgewebe, verschiedenen Hirnregionen, Erythrozyten, Leukozyten
-

Pathogene Mechanismen der FSEE

- Einlagerung in Zellmembranen und deren Funktionsstörung
 - Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung
 - Erhöhung der Instabilität von Lysosomen
 - Verminderung der Proteinsynthese und Zellproliferation
-

Eliminationshalbwertszeit

- Im Blut [69]: primär 173 min, terminal 693 min
 - In Fettgewebe [70]: $16 \pm 1,6$ h (in Ratten)
 - Nachweis mindestens 24 Std. nach Trinkende möglich [71]
-

Konzentrationen in Alkoholikern und in Meconium (Summe*)

- Serum (vital, BAK ≈ 1 mg/g) [72]: 0,4 - 0,75 $\mu\text{g/ml}$; Serum (vital, BAK 0,4-0,7 mg/g) [73]: 1,8 - 3,8 $\mu\text{g/ml}$
 - Blut (vital) [73-75]: $< 12,5$ $\mu\text{g/ml}$; 3 - 50 $\mu\text{g/ml}$
 - Herzgewebe (post mortem) [76]: 40 - 500 $\mu\text{g/g}$
 - Hirngewebe (post mortem) [76]: 4 - 170 $\mu\text{g/g}$
 - Fettgewebe (post mortem) [70]: 90 ± 14 $\mu\text{g/g}$
 - Meconium eines Neugeborenen [77]: 13,1 $\mu\text{g/g}$
 - Meconium von 725 Neugeborenen (108 positiv) [78]: 0 - 62 $\mu\text{g/g}$
-

* Analysiert wurden in den meisten Fällen: Ethyllaurat, Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethylpalmitoleat, Ethylstearat, Ethyloleat, Ethyllinoleat und Ethylarachidonat.

Sie entstehen in Anwesenheit von Ethanol aus freien Fettsäuren, Triglyceriden, Lipoproteinen oder Phospholipiden sowohl unter der Wirkung spezifischer zytosolischer oder mikrosomaler FSEE-Synthasen als auch vermittelt unspezifischer Enzyme wie der Carboxylesterase, der Lipoproteinlipase, der Carboxylesterlipase oder der Cholesterolesterase im Blut und in nahezu allen menschlichen Geweben. Die Bildungswege und der Zerfall sind in Abb. 3 dargestellt. In Tabelle 1 sind einige Eigenschaften dieser Verbindungen zusammengefasst. Im Folgenden soll ein kurzer Literaturüberblick über die wesentlichen Erkenntnisse zu dieser Substanzgruppe gegeben werden.

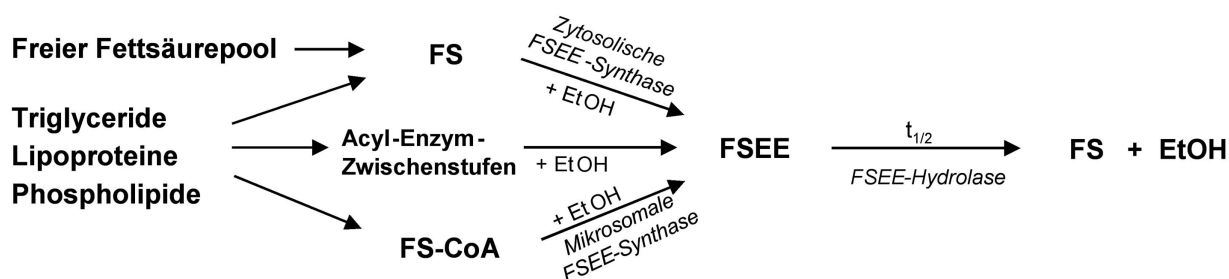


Abb. 3: Bildungs- und Zerfallswege von Fettsäureethylestern. FS = Fettsäure, FS-CoA = Coenzym A-aktivierte Fettsäure, FSEE = Fettsäureethylester.

Physikalische und chemische Eigenschaften der FSEE

Es handelt sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Fettsäureethylestern bei Raumtemperatur mit Ausnahme des unter Normalbedingungen als weißer, wachsartiger Festkörper vorliegenden Ethylstearats um farblose Flüssigkeiten mit leicht süßlichem, wachsartigem Geruch. Die Siedepunkte dieser Substanzen liegen bei reduziertem Druck zwischen 179°C (Ethylmyristat bei 12 Torr) und 214°C (Ethylstearat bei 15 Torr). Die Schmelzpunkte liegen zwischen -32°C (Ethyloleat) und 34°C (Ethylstearat). Die Dichte liegt im Bereich zwischen 0,86 und 0,87 g/cm³ [79].

FSEE sind sehr lipophile Verbindungen, deren Reaktivität in erster Linie von der Esterfunktion im Molekül geprägt ist. Neben der Hydrolyse können hier vor allem Umesterungsreaktionen stattfinden. In gelöstem Zustand stehen die FSEE im Gleichgewicht mit der entsprechenden Fettsäure und Ethanol, wobei die Gleichgewichtseinstellung im Körper enzymatisch katalysiert abläuft (s. unten). Sind weitere Verbin-

dungen mit Alkoholfunktion vorhanden, überlagern die Gleichgewichte der entsprechenden Umesterungsreaktionen.

Enzymatische Bildung, interzellulärer Transport, Verteilung und Spaltung von FSEE

Lange nahm zunächst an, dass die Veresterung von Ethanol durch eine Cholesterolesterase bewirkt wird [80]. Die von Coenzym A unabhängige Synthese von FSEE aus Ethanol und Fettsäuren in Kaninchenmyocard-Homogenisaten wurde 1984 von Mogelson, Lange et al. festgestellt [81]. Sie konnten die entsprechende FSEE-Synthase isolieren und bis zur Homogenität reinigen [82]. In späteren Untersuchungen wurde die Molmasse des Enzyms mit 55 kDa bestimmt und festgestellt, dass das gereinigte, homogene Enzym am stärksten den Umsatz von ungesättigten C₁₈-Fettsäuren katalysiert [83]. Aus der gleichen Gruppe wurde 1987 der Nachweis der Veresterung von Oleat mit Ethanol in Leukozyten [84] und in 10 verschiedenen Positionen des menschlichen Gehirns [85] erbracht, wobei die graue Hirnmasse höhere Enzymaktivität zeigte als die weiße.

Ein Satellitenenzym mit FSEE-Synthaseaktivität wurde ebenfalls von diesem Arbeitskreis als eine Glutathion-S-Transferase identifiziert [86]. Die Bildung von FSEE in Leber und Hirn von Mäusen, die 6 Tage Alkoholdämpfe eingeatmet hatten, wurde von Hungund et al. 1988 nachgewiesen [87]. Diese Autoren zeigten mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie, dass durch diese Verbindungen eine Störung der Membranordnung hervorgerufen wird. Spätere Versuche von Isenberg et al. an Neuroblastom- und Glioma-Zelllinien ergaben, dass die FSEE-Synthaseaktivität im Hirn bevorzugt in Zellen mit neuronalen Eigenschaften lokalisiert ist [88].

Die Bildung von Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat nach Alkoholgabe im Lungengewebe von Ratten wurde 1991 von Manautou und Carlson gemessen und ist niedriger als in der Leber und im Pankreas [89]. Durch Bora et al. wurde 1992 neben den bekannten FSEE-Synthasen I und III eine FSEE-Synthase II mit einer Molmasse von 65 kDa aus menschlichem Myocard isoliert und gereinigt, die im Gegensatz zu den beiden anderen keine Glutathion-Synthaseaktivität besitzt [90]. Diese ist besonders aktiv für Palmitat, Stearat, Oleat und Linolat. Versuche mit diesem Enzym und verschiedenen Alkoholen ergaben in der Reihenfolge von Methanol bis n-Butanol Michaelis-Menten Konstanten K_M von 1,16, 1,04, 0,58 und 0,33 M und V_{max} -Werte von 180, 100, 280 und 410 nmol/mg/h. Drei Synthasen für die Bildung von FSEE wurden durch Bora und Lange in der grauen Hirnsubstanz nachgewiesen und bis zur Homogenität gereinigt [91]. Durch cDNA-Klonen

wurde festgestellt, dass zwei dieser Enzyme GSH-S-Transferasen sind. Dies wurde als Ausgangspunkt für genetische Studien über alkoholbedingte ZNS-Schädigungen betrachtet. Der Zusammenhang zwischen FSEE-III-Synthase- und GSH-Transferaseaktivität konnte jedoch durch Board et al. nicht bestätigt werden [92]. Ein homogenes Enzym mit FSEE-Synthaseaktivität und Carboxylesteraseaktivität sowie einer Molmasse von 62 kDa wurde ebenfalls von Bora et al. aus menschlichem Myocard isoliert und bis zur Homogenität gereinigt [93].

Tsujita und Okuda gewannen eine Lipoproteinlipase mit FSEE-Synthaseaktivität und einer Molmasse von 57 kDa aus Rattenplasma [94]. Dieses bildet mit den Fettsäureresten eine Zwischenstufe, von welcher der Acylrest auf Ethanol übertragen wird. Die gleichen Autoren isolierten 1994 eine Carboxylesterlipase der Molmasse 74 kDa aus Schweinepankreas [95]. Die Acyl-Transferaseaktivität über die Zwischenstufe des acylierten Enzyms gegenüber Ethanol war etwa 35-30-mal höher als gegenüber Wasser. Treloar et al. berichteten über eine membrangebundene Acyl-CoA:Ethanol-Acyl-Transferaseaktivität in menschlichen Lebermikrosomen [96].

Hepatische mikrosomale FSEE-Synthasen wurden durch Kaphalia und Ansari mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender Gelfiltrations-Hochleistungs-Flüssigchromatographie isoliert und charakterisiert [97,98]. Dabei handelt es sich um verschiedene Isoenzyme der hepatischen mikrosomalen Carboxylesterase mit Molmassen um 60 kDa. Aufgrund unterschiedlicher Hemmung mit Tri-o-tolylphosphat konnten die Autoren in einer späteren Arbeit zeigen, dass in Leber, Plasma und Pankreas von Ratten unterschiedliche Enzyme wirksam sind [99].

Dan und Laposata fanden sowohl in einem Todesfall als auch bei der Inkubation von Hep-G2-Zellen mit Ethanol, dass Ethylpalmitat und Ethyloleat die bevorzugt gebildeten FSEE sind [71]. Es konnte keine bevorzugte Aufnahme- oder Enzymaffinität bei verschiedenen Fettsäuren festgestellt werden, jedoch war die Bildung von Ethylpalmitat eigenartigerweise unabhängig von der extrazellulären Palmitatkonzentration. Weitere Messungen zum Gesamtumsatz an Hep-G2-Zellen und zur unterschiedlichen Reaktivität der Fettsäuren wurden mit ¹⁴C-markierten Fettsäuren durchgeführt [100]. Dabei zeigte sich, dass frisch inkorporierte Säuren schneller reagieren als bereits länger in der Zelle vorhandene. In einer anderen Studie mit Hep-G2-Zellkulturen wurde gezeigt, dass sowohl mikrosomale als auch zytosolische FSEE-Synthasen wirksam sind, dass sowohl freie Fettsäuren als auch etwas bevorzugt Acyl-CoA umgesetzt werden und dass als intrazelluläre Substrate vor allem

Glycerollipide und andere Ester fungieren [101]. Als Carrier für die Ausschleusung aus der Zelle dienen Lipoproteine und Albumin.

Bei Applikation in den Magen-Darmtrakt von Ratten wurde festgestellt, dass FSEE im Magen bereits teilweise und in der Höhe des Zwölffingerdarms sehr schnell hydrolysiert werden [102]. Dies erklärt die scheinbare Ungiftigkeit bei Verwendung in der Lebensmittelindustrie.

Die FSEE-Synthase setzt freie Fettsäuren um, während für die Umwandlung von Acyl-Coenzym A eine Coenzym-A-Ethanol-O-Acyl-Transferase (AEAT) zuständig ist. Diczfalusy et al. charakterisierten mittels Hemmversuchen die Enzymaktivitäten der AEAT und der FSEE-Synthase an isolierten Lebermikrosomen von Ratten [103]. Sie fanden, dass unter normalen Bedingungen der AEAT-Mechanismus dominant sein sollte. Diczfalusy et al. führten in einer weiteren Arbeit vergleichende Untersuchungen an Homogenisaten von menschlicher Magen- und Darmmucosa, Pankreas, Leber, Herz, Lunge, Fettgewebe, Gallenblasenmucosa und Serum durch [104]. Danach besitzen Leber, Zwölffingerdarmmucosa und Pankreas die höchsten FSEE-Synthaseaktivitäten. Die Ester-spaltung verläuft hingegen am stärksten in der Leber und im Pankreas, während sie im Fettgewebe und im Herzen kaum nachweisbar ist. Die Autoren schlussfolgern daher, dass die FSEE überwiegend in der Darmmucosa als Hauptort der Resorption von Fettsäuren und Alkohol erzeugt werden. Sie gelangen von dort über den Blutweg zu den Organen und werden durch Lipoproteinrezeptor-vermittelte Aufnahmemechanismen in die Zellen eingelagert. Die geringe Hydrolyseaktivität im Herzmuskel und im Fett begründet die Akkumulation in diesen Geweben.

Eine Abnahme der FSEE-Synthaseaktivität und der damit gekoppelten GSH-Transferaseaktivität nach Gabe von L-Carnitin wurde in Versuchen mit Ratten von Calabrese und Rizza festgestellt, die diese Aminosäure daher für ein wirksames Mittel im Alkoholumanismus-Management ansehen [105]. Heith et al. fanden, dass die FSEE-Synthasen auch die Umesterung von Cocain zu Cocaethylen katalysieren [106].

Hamamoto et al. stellten bei der Untersuchung an Wistar-Ratten eine FSEE-Synthaseaktivität in fallender Reihenfolge in Pankreas, Leber, Testes und Herz fest, während Hirn und Skelettmuskulatur keine Aktivität zeigten [107]. Es wurde gefunden, dass die Amylaseaktivität im Pankreas in einer umgekehrten Korrelation zu dem FSEE-Gehalt steht, woraus auf die schädigende Wirkung der FSEE auf das Pankreas geschlossen wurde. Manautou et al. ermittelten an Lungenhomogenisat eine erhebliche FSEE-Bildung, wäh-

rend dort der Ethanol-Metabolismus über ADH sehr gering ist [108]. Tsujita und Okuda erhielten 1992 eine FSEE-Synthase in elektrophoretisch reiner Form aus Fettgewebe von Ratten [109]. Hemmversuche mit monoklonalen Antikörpern zeigten die Anwesenheit dieses Enzyms in Leber, Lunge und Hoden, jedoch nicht in der Niere. Unterschiede in der Zusammensetzung der in der Leber und im Pankreas gebildeten FSEE wurden bei Ratten durch Untersuchung der Sekrete von Laposata et al. festgestellt [110].

Leichte Lipoproteine (LDL) fungieren nach Bird et al. als physiologisches Vehikel für den Transport von FSEE in lebenden Zellen [111]. Bei den Versuchen wurden radioaktiv markierte FSEE verwendet. Die stärkere Bindung an Lipoproteine im Vergleich zu Serumalbumin wurde auch in einer NMR-Studie [112] und bei variablen Zusätzen von FSEE [75] bestätigt. Chang und Borensztajn halten hingegen Albumin für den wesentlichen physiologischen Carrier der FSEE und beschreiben eine einfache praktische Methode für das Auflösen von FSEE in wässrigem Medium durch Bindung an Albumin [113]. Die so gebundenen FSEE wurden leicht durch Alveolar-Makrophagen von Ratten aufgenommen und stellen allgemein einen experimentellen Zugang zur Erforschung der FSEE-Wirkung in Zellen dar. Neuere Untersuchungen von Best et al. ergaben, dass zwischen 5 und 20 % der FSEE des Vollblutes in den Erythrozyten vorliegen, wobei die Zusammensetzung sich von der im Plasma unterscheidet [114]. Die Autoren werten dies als Hinweis auf einen unabhängigen Stoffwechsel von FSEE in Erythrozyten und Plasma. Es wird von einer Inkorporation in Phospholipid-Doppelschichten ausgegangen, die für die alkoholbedingten Veränderungen in Erythrozyten mitverantwortlich gemacht wird.

Saghir et al. inkubierten an Phospholipide (LDL) gebundene FSEE mit menschlichem Vollblut, Plasma, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten [115]. Dabei stellten sie fest, dass die Hydrolyse der Ester vor allem in den Blutzellen und nur unwesentlich im Plasma abläuft.

Aleryani et al. schlussfolgerten aus einer Proportionalität von Aspartat-Aminotransferase und FSEE-Synthase im Blut, dass FSEE-Synthasen analog anderen Enzymen bei alkoholbedingter Zellschädigung aus Leber und Pankreas ins Blut gelangen [116]. Gorski et al. überprüften die verschiedenen Blutbestandteile auf ihre Fähigkeit, FSEE zu synthetisieren [117]. Sie stellten eine FSEE-Synthaseaktivität in Vollblut und vor allem in Leukozyten fest. Dabei besaß die Lymphozyten-Monozytenfraktion eine ca. dreifach höhere Aktivität im Vergleich zur Granulozyten-Fraktion. Alkoholiker besaßen dabei nur etwa die Hälfte

der Leukozyten-FSEE-Synthaseaktivität im Vergleich zu den Normaltrinkern. Es blieb ungeklärt, ob dies eine Folge des Alkoholmissbrauchs oder genetisch bedingt ist.

Pathologische Wirkungen von FSEE

Die Anwesenheit von FSEE in den verschiedenen Organen wurde in vielen der bereits zitierten Arbeiten mit den für Alkoholmissbrauch bekannten Organschädigungen in Zusammenhang gebracht [118]. Darüber hinausgehende Beweise sind jedoch relativ selten. Lange und Sobel stellten bereits 1983 bei der Inkubation isolierter Myocard-Mitochondrien mit FSEE fest, dass diese eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und damit die Ineffizienz der Energieproduktion des Herzmuskels bewirken und werteten dies als Ursache für die alkoholbedingte Herzmuskelschädigung [119]. Ein Zusammenhang zwischen der Akkumulation von FSEE in bestimmten Organen, die keinen oxidativen Alkoholmetabolismus aufweisen, und den alkoholbedingten Organschädigungen wurde 1985 von E. A. Laposata und Lange beschrieben [118].

Werner et al. stellten bei Inkubierung von Zellhomogenisaten der Leber und des Pankreas mit Ethanol fest, dass durch Inhibierung des oxidativen Alkoholabbaus der Umsatz zu FSEE auf das doppelte bis dreifache ansteigt [120]. 48-stündige Infusion von FSEE in Ratten führte zu Ödemen des Pankreas, pankreatischer Trypsinogenaktivierung und Vakuolisierung der Acinuszellen [121]. In anderen Versuchen mit Ratten wurde durch die gleichen Autoren gezeigt, dass nach Inhibierung der Oxidationswege des Alkohols mit 4-Methylpyrazol (ADH-Inhibitor), 3-Amino-1,2,4-triazol (Katalase-Inhibitor) und Diallylsulfid (MEOS-Inhibitor) die Pankreasschädigungen signifikant mit der FSEE-Konzentration zunehmen [122]. Pfutzer et al. stellten hingegen in Versuchen mit Wistar-Ratten fest, dass chronischer Ethanol-Konsum die Exprimierung der FSEE-bezogenen Gene in der Leber und im Pankreas induziert, jedoch nicht im Herzmuskel und im Hirn [123]. Diese Enzymaufregulierung wird als ein zentraler Mechanismus für die alkoholbedingte Pankreatitis angesehen.

Haber et al. inkubierten 1993 Lysosomen der Pankreaszellen von Ratten mit Ethyloleat und stellten durch Messung der Aktivitäten von N-Acetylglucosaminidase und Cathepsin B eine Zunahme der Lysosomenfragilität fest [124]. Diese wurde als Bestätigung der vermittelnden Rolle der FSEE bei den alkoholbedingten Pankreasschäden gewertet. Ein Zusammenhang zwischen FSEE-Konzentrationen und alkoholbedingter Pankreasschädigung geht auch aus Untersuchungen von Kaphalia und Ansari hervor [125].

Toxische Wirkungen von FSEE auf Hep-G2-Zellen wurden von M. Laposata et al. festgestellt [63]. In einer anderen Arbeit wurden eine Abnahme der menschlichen Leberzellproliferation und der Proteinsynthese in Anwesenheit von FSEE nachgewiesen [126]. Hasaba und Laposata zeigten bei Versuchen mit Hep-G2-Zellen, dass die in diesen Zellen synthetisierten FSEE durch Lipoproteine und Albumin ausgeschleust werden, wobei das Lipoprotein gleichzeitig eine Erhöhung der Bildungsrate bewirkt [127].

Gubitosi-Klug und Gross stellten experimentell eine Beschleunigung der Kinetik von bestimmten spannungsabhängigen K^+ -Kanälen im menschlichen Gehirn durch FSEE fest und sahen dies als Ursache für die pathophysiologischen Folgen des Alkohols an [128]. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen fetalem Alkoholsyndrom und FSEE wurde weiterhin von Bearer et al. aus dem Nachweis in der Plazenta von Menschen und Mäusen geschlussfolgert [129].

Analytischer Nachweis und Bestimmung von FSEE

Kinnunen und Lange verwendeten eine quantitative Methode zur Analyse von FSEE aus Gewebeproben, in der Aceton als Extraktionsmittel benutzt wurde [130]. Die Trennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgelplatten vorgenommen, und die individuellen Fettsäureethylester wurden danach mittels GC-MS identifiziert. Eine Zweistufenmethode zur Reinigung von FSEE bestehend aus einer Festphasenextraktion an Aminopropyl-Kieselgelsäulen, gemeinsamer Elution von FSEE und Cholesterylestern mit Hexan und anschließender Abtrennung durch HPLC an einer ODS-Säule mit Isopropanol/Wasser als mobiler Phase wurde von Bernhard et al. entwickelt [131]. Am Beispiel von Ethyloleat ergab sich eine Ausbeute von $70 \pm 3 \%$. Diese Methode wurde von Dan et al. auf die GC-MS übertragen [100] und von Zybko et al. für Blutproben weiter verbessert [132,133]. Mittels GC-MS wurden die Ethylester der Fettsäuren 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3n-3, 20:3n-6, 20:4, 20:3n-6, 20:5n-3 und 22:6n-3 gemessen.

Als wesentliche präanalytische Bedingungen bei der Bestimmung von FSEE wurden von Soderberg et al. das Geschlecht der Probanden, die Serum- oder Plasma-Triglycerid-Konzentration, Dauer und Temperatur der Probenlagerung, Art der konsumierten alkoholischen Getränke sowie Geschwindigkeit des Konsums überprüft [73]. Danach haben Männer bei auf das Gewicht bezogener gleicher Alkoholdosis etwa doppelt so hohe FSEE-Konzentrationen. Lagerung bei 4°C führte zu keiner Änderung der Konzentrationen, bei Raumtemperatur wurde aber eine deutliche Zunahme gefunden. Der Effekt der verschie-

denen zur Blutprobennahme verwendeten Antikoagulantien auf die Ergebnisse der FSEE-Analyse wurde von Salem et al. untersucht [132]. Danach wurden aus Röhrchen mit Heparin und Natriumcitrat etwa gleiche Ergebnisse gefunden wie ohne Zusatz, EDTA führte hingegen zu einer drastischen Abnahme der Werte. Bei den noch alkoholhaltigen Vollblutproben wurde bei 25 und 37°C eine stetige Zunahme der FSEE gemessen, wobei wahrscheinlich ein Gleichgewicht erreicht wird. Die Autoren empfehlen die Abtrennung von Serum oder Plasma innerhalb 4 h und die weitere Lagerung bei -4 bis -80°C sowie die Vermeidung von EDTA-Röhrchen.

Quantitative Angaben zu den Konzentrationen liegen nur in wenigen Arbeiten vor. DePergola et al. ermittelten eine Summenkonzentration von ca. 300 nmol/g der Ethylester von Linolensäure, Oleinsäure, Stearinsäure und Palmitinsäure im Fettgewebe von Ratten, die über 10 bzw. 17 Wochen zwischen 9 und 16 g Ethanol/kg KG/Tag erhalten hatten [133]. Versuche mit ^{14}C -markiertem Alkohol ergaben eine Halbwertszeit der Ester von weniger als 24 h. Durch Lipase wurden sie langsamer gespalten als Triglyceride. Doyle et al. bestimmten FSEE im Serum von 37 Notfallpatienten und fünf Probanden nach definierter Ethanoldosis [69]. Sie fanden eine Korrelation zwischen den Konzentrationen von Ethanol und FSEE. Im FSEE-Pool war der Anteil gesättigter Fettsäuren höher als im Pool der freien Fettsäuren. Im Serum sind die FSEE an Lipoproteine und Albumin gebunden. FSEE-Konzentrationen bis 42 $\mu\text{mol/l}$ wurden von M. Laposata et al. im Serum gemessen [74]. Der Nachweis im Fettgewebe gelang sowohl nach Applikation von Alkohol als auch von FSEE-Kapseln.

In einer weiteren Arbeit [134] wurde versucht, FSEE in Haarextrakten mittels Flüssiginjektion eines Flüssig/Flüssig-Extraktes bzw. eines zuvor einer Festphasenextraktion unterworfenen Extraktes mit GC-MS nachzuweisen. Dieses Vorgehen führte jedoch aufgrund der extrem hohen Matrixbelastung der so erhaltenen Extrakte nicht zu den erforderlichen Nachweisgrenzen im Bereich von wenigen pg pro mg Haar.

Bisherige Nutzung von FSEE als Alkoholmarker

Die Bedeutung der FSEE als Alkoholmarker wurde in der Literatur, vor allem in den Arbeiten von Laposata und Mitarbeitern, immer wieder betont, systematische Studien sind jedoch selten und Anwendungen in der Praxis beschränken sich auf die Bestimmung in Meconium. Der geringe Zuspruch für diesen direkten Alkoholmarker ist sicher auch durch die bislang sehr aufwändige Analytik begründet.

Bjorntorp et al. bestimmten 1990 die FSEE-Konzentrationen und die FSEE-Synthaseaktivitäten in menschlichem Fettgewebe für Abstinenzler, Normaltrinker, Alkoholiker in Entzugsbehandlung und Alkoholtodesfälle [135]. Die Abstinenzlerproben wiesen keine FSEE-Synthaseaktivität auf, und es wurde ein Anstieg mit dem Grad des Alkoholkonsums festgestellt, was auf eine Ezyminduktion zurückgeführt wurde, die nach Abstinenzbeginn mit einer Halbwertszeit von mehreren Wochen abklingt. Die FSEE-Synthaseaktivität von Fettgewebe wurde daher als potentieller Alkoholmarker vorgeschlagen. Yamazaki et al. bestimmten 1997 die Konzentrationen der Methyl- und Ethylester im Herzmuskel und im Hirngewebe von 47 Todesfällen [76]. Die FSEE-Konzentrationen lagen zwischen 0 und 1778 nmol/g im Herzmuskel bzw. 0 und 767 nmol/g im Hirngewebe.

Eine klinische Studie zur Prüfung, ob FSEE im Blut als Kurzzeit-Marker für Alkoholaufnahme geeignet sind, wurde von Doyle et al. mit 48 Blutproben von 7 Probanden durchgeführt [72]. Der FSEE-Abfall folgte zunächst der Alkohol-Zeit-Kurve, verlief aber in der sekundären Phase viel langsamer, sodass sich für mindestens 24 Stunden nach der Einnahme ein positiver Befund ergab. Die Spitzenwerte lagen zwischen 2.000 und 3.000 nmol/l.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Ethyllinolat im Meconium und den Trinkangaben der Mütter für die Zeit vor und während der Schwangerschaft wurde von Bearer et al. beschrieben [136]. Klein et al. bestimmten im Meconium eines Neugeborenen, dessen Mutter über die gesamte Schwangerschaft Bier getrunken hatte, eine FSEE-Konzentrationsumme von 13,1 µg/g, während bei den Neugeborenen abstinenten Mütter im Mittel 0,41 µg/g gemessen wurden [77,137]. Weiterhin wiesen diese Autoren nach, dass Ethyllinolat auch in isoliertem Meconium nach Versetzen mit Ethanol gebildet werden kann. Die Analyse von FSEE in Meconium als Marker für intrauterine Alkoholbelastung des Fötus wurde auch von Moore et al. in zwei Publikationen beschrieben [78,138]. In einer Studie mit zwei Gruppen von Neugeborenen auf Hawaii (n = 463, 73 positiv) und in Utah (n = 289, 35 positiv) werden Konzentrationen oberhalb 10 µg/g als signifikant für eine Alkoholbelastung während der Schwangerschaft angesehen [78].

Da sich die FSEE in menschlichem Gewebe in einem ständigen enzymatisch katalysierten Gleichgewicht mit Alkohol und Fettsäuren oder Lipiden befinden, sind sie als Langzeitmarker nur verwendbar, wenn sie diesen Gleichgewichten durch Speicherung entzogen werden. Hierfür sind die Haare besonders geeignet.

2.2 Grundlagen der Haaranalytik

2.2.1 Aufbau und Struktur des Haares

Das Haar ist aus morphologischer Sicht ein äußeres Hautanhangsgebilde. Es ist im Mittel ca. 70 µm dick [139] und besteht aus der Haarwurzel (Haarfollikel) und dem Haarschaft („reifes“ Haar). Die Haarwurzel ist in der Lederhaut verankert und reicht bis in die Unterhaut hinein. Sie ist von zahlreichen Kapillarblutgefäßen und Nerven umgeben. Zu jedem Haar gehört eine Talgdrüse, von der ein Kanal zum oberen Teil der Haarwurzel hin verläuft. Der Haarbalgmuskel sorgt dafür, dass jedes Haar aufgerichtet werden kann. Die ekkrinen Schweißdrüsen befinden sich zwar in der Nähe der Haarwurzel, sind aber von ihr getrennt. Eine schematische Darstellung eines Haars in seiner natürlichen Umgebung ist in Abb. 4 dargestellt.

Die Haarwurzel besteht aus mehreren konzentrischen Schichten, die in einem histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden können (vgl. Abb. 5 rechts). Am unteren Ende weitet sie sich zum Bulbus, in dem die Haarpapille sitzt, die ein Netzwerk aus Kapillarblutgefäßen und Fibroblasten enthält und für die Versorgung des wachsenden Haares mit metabolischem Material sorgt. Die unmittelbar an die Papille grenzende, ihr kappenförmig aufsitzende Zellschicht nennt man Basalmembran. In dieser Zellschicht befinden sich die Matrixzellen der drei Schichten des späteren Haarschaftes (Medulla, Cortex und Cuticula) sowie der inneren und der äußeren Wurzelscheide (s. Abb. 5 links). Diese wiederum bestehen aus weiteren Schichten, die dem austretenden Haar seine Form geben und besondere Funktionen beim Transport von Aminosäuren übernehmen.

In Abb. 6 sind die im wachsenden Haar ablaufenden Prozesse schematisch dargestellt. Die schnelle Zellteilung im unteren Teil des Haarfollikels führt zu einer Wanderung der Zellen in Richtung Hautoberfläche. In der nächsten Zone wird das Gen zur Keratinisierung exprimiert, wobei die weitere Entwicklung der Zellen für Cortex- und Cuticulazellen in unterschiedlicher Weise verläuft. Die Cortexzellen ändern ihre Form von der anfänglich sphärischen in eine spindelartige Form. In den Zellen werden Proteinfilamente aufgebaut, welche die Zelle ausfüllen und schließlich verschmelzen. In der Aushärtungszone werden Disulfidbrücken geknüpft und es finden Resorption und Dehydratation statt, bis schließlich alle zytoplasmatischen Organellen verschwunden sind. Die Überreste der Zellen werden durch membranartige Strukturen (Zellmembrankomplex) miteinander verbunden. Die Cuticulazellen stammen von Matrixzellen aus dem äußeren Bereich der Haarpapille und

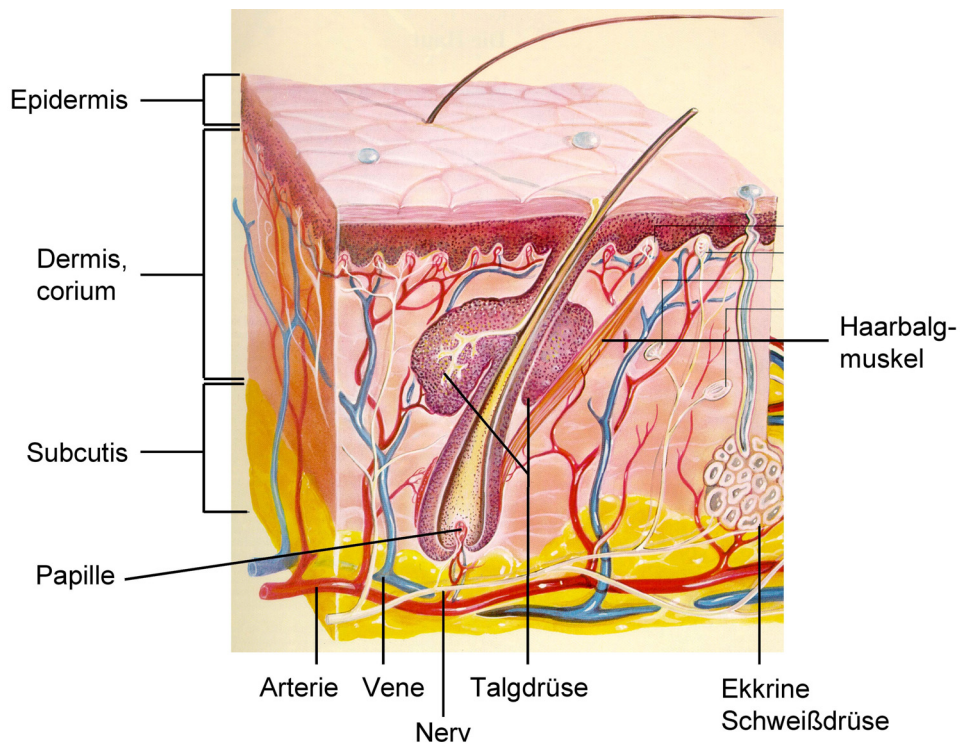


Abb. 4: Schematische Darstellung der Haarwurzel und der Hautschichten, entnommen aus [140].

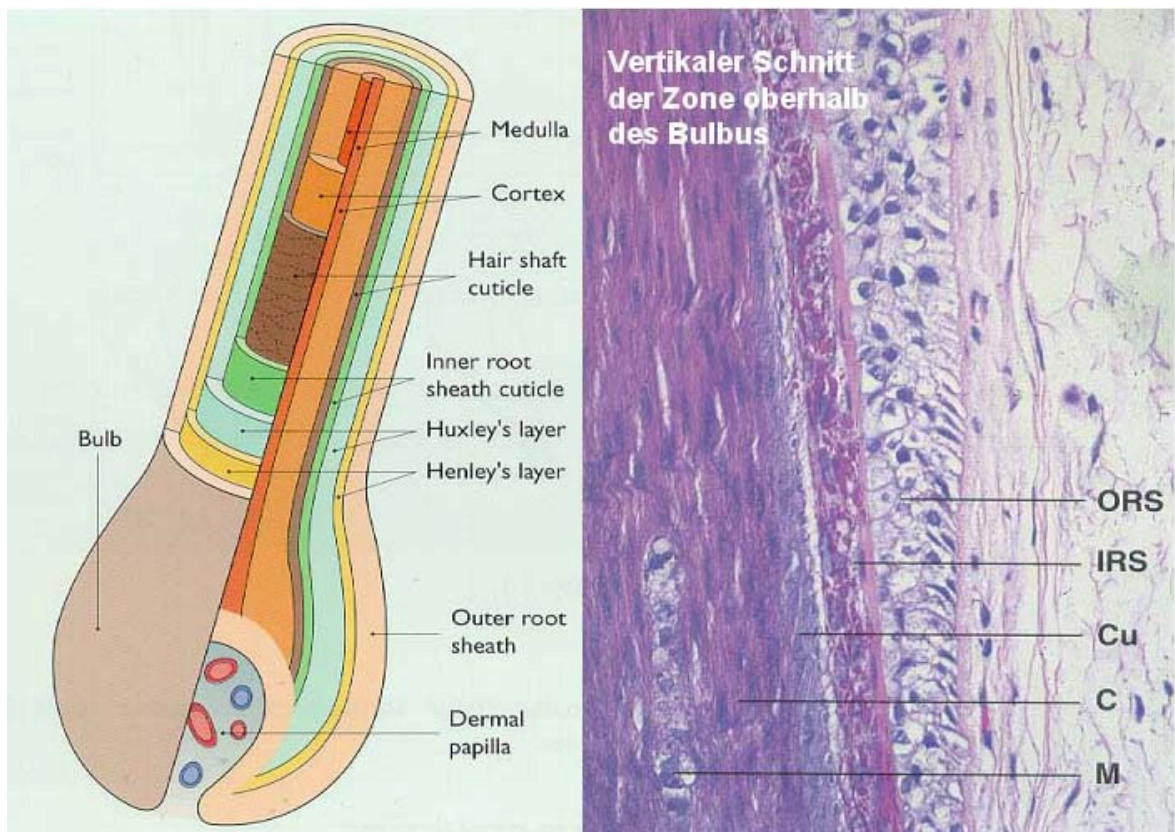


Abb. 5: Schichtartiger Aufbau der Haarwurzel; schematischer Aufbau (links) und histologischer Schnitt unter dem Elektronenmikroskop (rechts). M = Medulla, C = Cortex, Cu = Cuticula, IRS = innere Wurzelscheide, ORS = äußere Wurzelscheide. Entnommen aus [141].

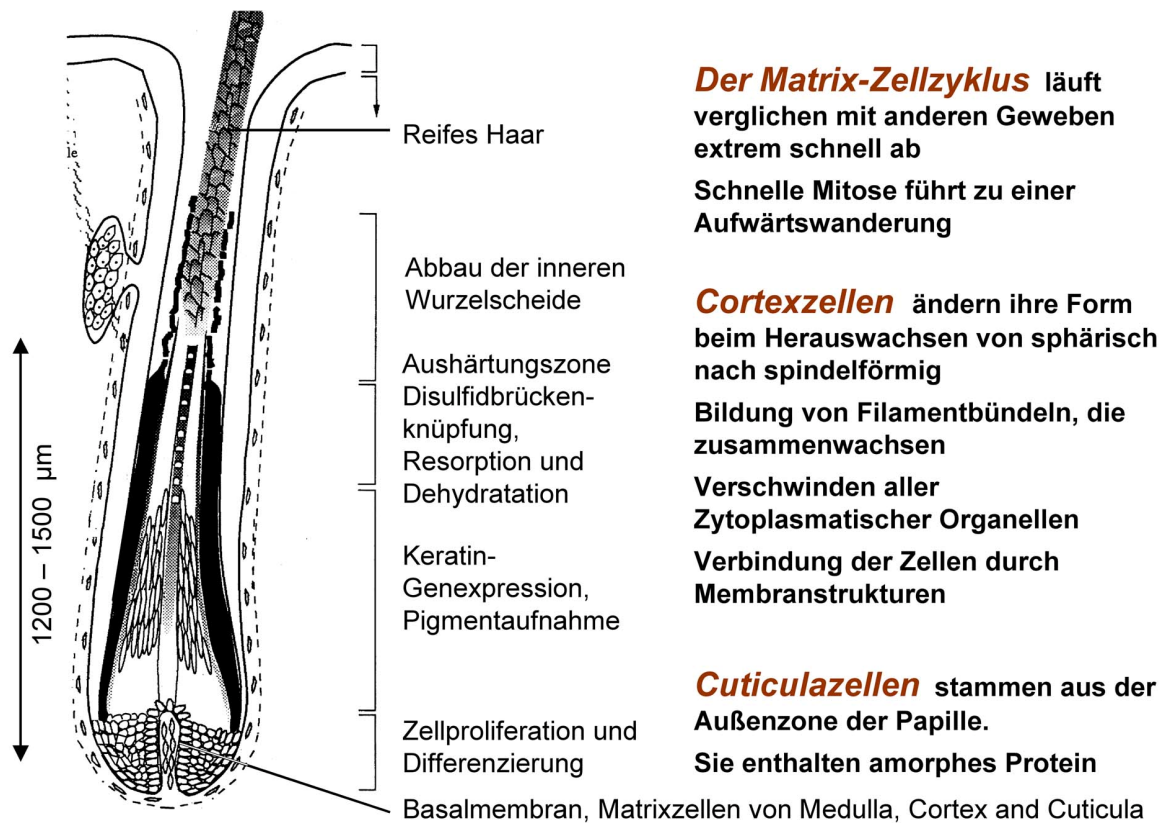


Abb. 6: Das wachsende Haar in der Anagenphase (aus [142], S. 81).

verändern ihre Form im weiteren Verlauf zu einer amorphes Protein enthaltenden Struktur mit schindelartigem Aufbau. Auf Höhe des Kanals der Talgdrüse wird die innere Wurzelscheide abgebaut und das Sebum umhüllt für zwei bis drei Tage das nunmehr fertige Haar vollständig, bis es an der Hautoberfläche austritt. Das dort erscheinende, voll ausgereifte Haar besteht im Querschnitt von außen nach innen aus Cuticula, Cortex und der Medulla. Weitere Bestandteile des Haars sind der aus Lipiden bestehende Zellmembrankomplex, der vor allem die Zwischenräume der Cortexzellen füllt, und die Melanineinlagerungen, die sich sowohl im Cortex als auch in der Medulla finden.

Cuticula

Diese 4-5 µm dicke und aus 5-10 Zellschichten bestehende Hülle schützt das Haar vor physikalischen und chemischen Beeinflussungen (UV-Strahlung, Feuchtigkeit etc.). Sie besteht aus der stark cysteinhaltigen (25-30 %), proteolysestabilen Exocuticula und der proteolyseempfindlichen Endocuticula [142,143] und besitzt einen schindelartigen Aufbau

Cortex

Der Cortex ist aus einem Bündel spindelförmiger, parallel zur Haarachse angeordneter Zellen aufgebaut und enthält Makrofibrillen, die aus mehreren α -helikalen Intermediat-filamenten bestehen. Diese Keratinfasern enthalten große Mengen an Cystein, das über Disulfidbrücken zum Cystin vernetzt ist und den entscheidenden Grund für die mechanische und chemische Stabilität der Haarfaser darstellt. Die hydrophilen Aminosäuren Glutaminsäure (1,0 mmol/g Haar) und Asparaginsäure (0,45 mmol/g) [144] sind nach außen gekehrt und für die hohe Wasser-Aufnahmekapazität der Haare von bis zu 30 % ihres Eigengewichts und für die Kationenaustauscher-Eigenschaften verantwortlich.

Medulla

Die Medulla befindet sich in der Mitte des Haars und wird von den Cortexzellen umschlossen. Sie weist neben Lufteinschlüssen und Melanin einige ungeordnete Proteingranula auf, die über Isopeptidbindungen verknüpft und nicht in gewöhnlichen Proteinsolventien löslich sind [142].

Zellmembrankomplex

Der Zellmembrankomplex ist eine zwischen den Zellen des Keratingewebes existierende Phase laminarer Struktur und setzt sich aus Protein- und Lipidschichten zusammen, die ein Netzwerk um Cortex- und Cuticulazellen formen. Dabei weisen die Lipidschichten anders als bei Zellmembranen keine Phospholipidstruktur auf und beinhalten bis zu 50 % 18-Methyleicosansäure [145].

Melanineinlagerungen

Melanin ist für die Farbe des Haares verantwortlich und wird in den Melanosomen (Zellorganellen der Melanozyten) gebildet. Die Melanozyten sind im Bulbus vorwiegend in der Basalschicht des Cortex oberhalb der Papille lokalisiert. Die langen Dendriten dieser Zellen dringen in benachbarte Keratinozyten ein und entleeren dort Melanosome enthaltende Vesikel. Nach einer phagozytoseartigen Auflösung der Membranen von Vesikeln und Melanosomen bleiben die Pigmente in die Keratinozyten eingebettet zurück. Im ausgereiften Haar sind die Melaningranula sowohl im Cortex als auch in der Medulla zu finden. Zusammensetzung und Konzentration des Melanins im Haar bestimmen die Haarfarbe. Der Melaninanteil des Haars beträgt ca. 0,1-5 Gew.-% [144,146], wobei schwarzes Haar die höchsten Melaninmengen enthält, helleres Haar hingegen weniger und kleinere Melaninpigmente aufweist [147,148].

2.2.2 Die Wachstumsphasen der Haare

Das Kopfhaar durchläuft in seiner 2- bis 7-jährigen Entwicklung drei Wachstumsstadien: die durchschnittlich 2- bis 6-jährige Anagenphase, die 2- bis 3-wöchige Katagenphase und die bis zu 6-monatige Telogenphase [144,149,150]. Während der Anagenphase wächst das Haar mit individuell unterschiedlichen und von der Körperregion abhängigen Wachstumsraten. Für menschliches Kopfhaar wurden Raten von 0,2 bis 0,5 mm/Tag gemessen [151]. In der Katagenphase bildet sich die Haarwurzel innerhalb von 2-3 Wochen zurück, die Nährstoffversorgung und damit das Wachstum verlangsamt sich bis hin zum Stillstand. Es schließt sich die Telogenphase an, in der das Haar noch für bis zu 6 weitere Monate in der Kopfhaut verbleibt, bis ein neues Haar gebildet wird, welches das alte herauschiebt. Dieser Prozess ist in Abb. 7 dargestellt. Beim Menschen laufen diese Wachstumszyklen nicht synchronisiert ab, jedes Haar durchläuft einen individuellen Zyklus. Die Dauer der einzelnen Stadien wird von androgenen Hormonen kontrolliert und hängt vom Ort der Behaarung, dem Alter, dem Geschlecht sowie von genetischen Faktoren ab. Der Anteil der Haare in der anagenen Phase liegt bei menschlichem Kopfhaar zwischen 80 und 85 %, in der katagenen Phase befinden sich 1-3 % und in der telogenen 10-15 % der Haare. Während eines krankhaften oder altersbedingten Haarausfalls (Alopecie) kann der anagene Anteil auf unter 30 % sinken [152].

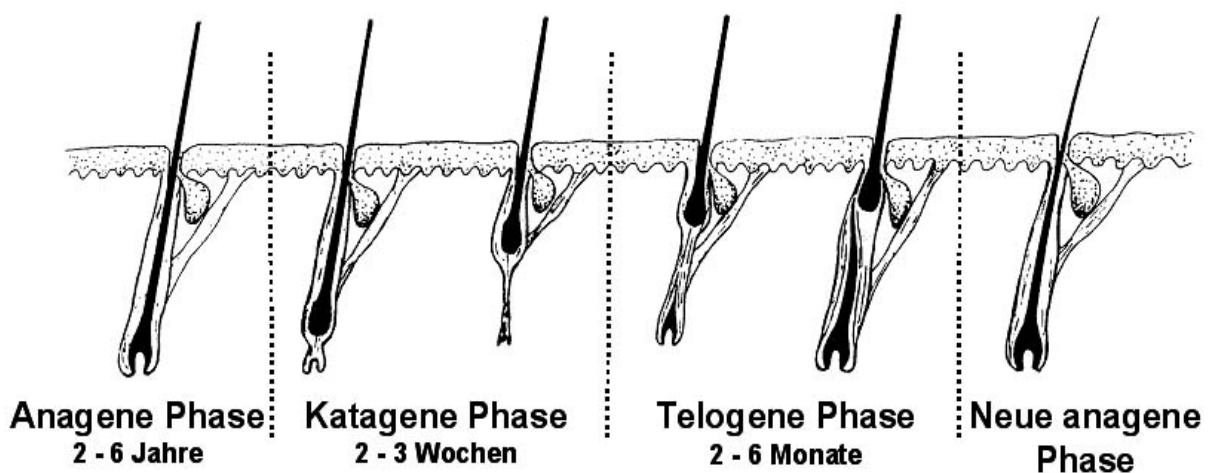


Abb. 7: Der Haarwachstumszyklus bei menschlichem Kopfhaar, entnommen aus [153].

2.2.3 Physiologie der Sebumproduktion

Sebum wird in den Talgdrüsen, die einen Bestandteil jeder Haarwurzel bilden, nach einem holokrinen Mechanismus gebildet [154,155]. Die an der Basalmembran durch Teilung entstehenden Sebumzellen durchlaufen dabei eine Reifungszone, in der sie Lipide akkumulieren und auf das 100-150fache ihres ursprünglichen Volumens anwachsen. Danach unterliegen sie der Nekrose und Lysis und setzen die Lipide in den Drüsenkanal frei, an dessen Ende sie den Haarschaft erreichen und diesen umhüllen. Der Transport am Haar entlang erfolgt durch Oberflächendiffusion und gegenseitige Berührung der Haare. Die Sebumschicht verhindert, dass das Haar spröde wird und bricht. Sie wird bei der Kopfwäsche regelmäßig entfernt und erneuert sich danach innerhalb von wenigen Tagen.

Sebum wird in etwa gleicher Menge auch in den Talgdrüsen der winzigen Vellushaare auf der „unbehaarten Haut“ produziert und bildet dort den überwiegenden Teil des Oberflächenfettes der Haut, das zusätzlich Lipide der abgeschilferten Hautzellen enthält. Dieses Oberflächenfett der Haut, das sich als dünner Film auch auf der Haaroberfläche findet, besteht im Durchschnitt etwa zu 30 % aus Triglyceriden, zu 27 % aus Wachsen, zu 24 % aus Fettsäuren, zu 12 % aus Squalen, zu 2 % aus Diglyceriden und zu 4 % aus Cholesterin und dessen Estern [156,157]. Die in den Triglyceriden und Wachsen enthaltenen Fettsäuren und Fettalkohole werden in den Zellen selbst synthetisiert und sind in ihrer Zusammensetzung spezifisch für Sebum. Der Fettsäureanteil enthält im Gegensatz zu den üblicherweise physiologisch vorkommenden Fettsäuren auch ungeradzahlige, verzweigte und an ungewöhnlicher Stelle ungesättigte Fettsäuren, setzt sich aber hauptsächlich aus gesättigten und monounsättigten Fettsäuren mit einem kleinen, variablen Anteil an Monomethylverzweigungen zusammen. Die freien Fettsäuren sowie Mono- und Diglyceride werden durch Lipasen von Bakterien, die in den Haarfollikeln und auf der Hautoberfläche siedeln, aus den Sebumbestandteilen (Fette und Wachse) generiert. Die freien unverzweigten Fettsäuren besitzen hauptsächlich eine geradzahlige Kohlenstoffanzahl. In erster Linie treten dabei Myristinsäure (ca. 8 %), Palmitinsäure (ca. 18 %), Stearinsäure (ca. 5 %) und Ölsäure (ca. 18 %) auf [144], wobei relativ große interindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung gefunden werden.

Die Sebumproduktion wird durch Hormone kontrolliert und hängt von Alter und Geschlecht der Person, von der Tageszeit und zu gewissem Grade auch von der Jahreszeit ab. Die mittlere Zeitspanne zwischen Erzeugung des Sebums und der Ausscheidung

beträgt etwa 8 Tage, wobei sich die Dauer des Zellzyklus mit zunehmendem Lebensalter verlängert [155,157].

2.2.4 Einlagerung von Substanzen ins Haar

Für eine zeitliche Bewertung von Befunden bei segmentweiser Untersuchung von Haarproben spielt neben der Wachstumsgeschwindigkeit die Frage nach dem Einlagerungsmechanismus eine entscheidende Rolle, da die Bewertung der Ergebnisse einer abschnittswisen Haaranalyse hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs einer Substanzaufnahme nur sinnvoll ist, wenn die Substanzeinlagerung über den Blutkreislauf in der Haarwurzel stattfindet und somit auf die im Entstehen begriffenen Haarstrukturen begrenzt ist.

1989 stellten Baumgartner et al. als erstes erklärendes Modell ein „Entrapment-Model“ vor [158], wonach über die Blutversorgung eine Einlagerung von Substanzen und deren Metaboliten in so genannte „inaccessible regions“ erfolgt. Würde dieses Modell zutreffen, so wären die eingelagerten Substanzen im Haar vor externen Einflüssen geschützt und eine Kontamination mit Analyten von außen würde nicht zu einer Einlagerung in das Haar führen, könnte also leicht durch eine sorgfältige Probenvorbereitung wie z. B. der Durchführung geeigneter Waschprozeduren beseitigt werden. Da viele Befunde mit diesem einfachen Modell nicht in Einklang zu bringen waren, postulierte Henderson 1993 ein Multikompartimenten-Modell [159], das von einem komplexeren Mechanismus ausgeht, an dem mehrere Kompartimente beteiligt sind. Die Kompartimente Blut, Schweiß, Talg, angrenzende Hautschichten sowie die externe Kontamination sollen im Folgenden kurz besprochen werden.

Einlagerung über die Blutversorgung

Der Einlagerungsweg über das Blutgefäßsystem spielt für viele Drogen und Pharmaka die größte Rolle. Handelt es sich um basische, nicht proteingebundene, undissoziierte und lipophile Stoffe, so können diese entlang von Konzentrations- und pH-Gradienten durch Zellmembranen in das Keratinozytengewebe, in Matrixzellen und Melanozyten der Haarwurzel des anagenen Haares gelangen. Weitere wichtige Faktoren, die den Transport der Substanzen durch Biomembranen beeinflussen, sind der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient sowie die Größe und Geometrie des Moleküls. Eine besondere Bedeutung für die Einlagerung von Substanzen kommt dabei den Melanozyten zu. Sie weisen im Unterschied zum keratinisierten Haar, das einen intrazellulären pH-Wert von ca. 6 besitzt [144],

pH-Werte zwischen 3 und 5 auf [160]. Auch das Zytoplasma der Matrixzellen besitzt einen niedrigeren pH-Wert als das Blutplasma. Dadurch kommt es entsprechend dem pH-Gradienten zu einer bevorzugten Aufnahme und Anreicherung von basischen Substanzen in Melanozyten und Matrixzellen [161], von wo sie dann in die Melaningranula, in die Haarproteine und Haarlipide eingelagert werden.

Einlagerung über Schweiß und Sebum

Gelöste Stoffe können auch über die Ausscheidungen von Schweiß- und Talgdrüsen in das Haar gelangen. Lipophile Moleküle diffundieren dabei entlang des Zellmembrankomplexes, während hydrophile Substanzen während des Quellvorgangs eingeschleust werden. Da die ekkrinen Schweißdrüsen und die Talgdrüsen in der Kopfhaut sehr eng beieinander liegen, kann sich aus Schweiß und Sebum eine Emulsion bilden, die das Haar benetzt. Daher lässt sich allein durch Haaranalyse nicht entscheiden, aus welchem Sekret die Einlagerung einer Substanz ins Haar erfolgte. Allerdings lässt sich voraussagen, dass lipophile Substanzen eher im Sebum, hydrophile dagegen zu einem höheren Anteil im Schweiß wiederzufinden sind.

Bei der Beurteilung von Ergebnissen der Haaranalyse muss berücksichtigt werden, dass geeignete Substanzen bei starker Schweiß-/Sebumsekretion zu einem positiven Nachweis auch an Stellen im Haar führen können, die lange vor der Einnahme gewachsen sind. Dies kann zu zeitlichen Fehlinterpretationen führen [151].

Einlagerung aus angrenzendem Hautgewebe

Vor allem stark lipophile Substanzen können aus dem Blut in tiefere Hautschichten gelangen, dort akkumulieren und zeitlich verzögert unter Verbreiterung der Zone mit positivem Substanznachweis in das Haar eingelagert werden. Auch eine Aufnahme von Substanzen aus externen Quellen in die Haut mit nachfolgender Einlagerung ins Haar ist denkbar [159,162].

Einlagerung aus externen Quellen

Auch eine Kontamination der Haare über den Rauch von Cannabis-, Nikotin- bzw. Crack-rauchern [163,164], durch Stäube oder durch kontaminierte Haarkosmetika wurde beobachtet. So wies Mieczkowski Cocain im Waschwasser der Haare von mehreren nicht drogenabhängigen Drogenfahndern nach, die häufig mit Cocain in Berührung kamen [165]. Die Gefahr von falsch positiven Haaranalysen ist aber bei gründlicher Probenvorbehandlung (geeignete Waschschrte vor der Probenextraktion) und differenzierter Beurteilung positiver Haaranalysen als sehr gering einzustufen, da nach äußerer Kontamination in

der Regel keine Metaboliten der entsprechenden Ausgangssubstanzen nachgewiesen werden können [158,165,166] und eine kritische Bewertung der quantitativen Ergebnisse unter Berücksichtigung der Konzentrationen in den bei den Waschvorgängen erhaltenen Lösungen erfolgen kann.

Einfluss von kosmetischen Behandlungen und Witterungsbedingungen

Bei gesundem unbehandeltem Haar stellt die Cuticula eine Barriere gegen den Verlust von Substanzen dar. Viele eingelagerte Substanzen sind bei normaler Haarwäsche noch Jahre nach dem Konsum nachweisbar. Allerdings können kosmetische Behandlungen der Haare mit Bleich- oder Färbemitteln und Dauerwellenbehandlung irreversible morphologische, physikalische und chemische Veränderungen des Haars hervorrufen, die zu einem verstärkten Ausdiffundieren oder einer verminderten Aufnahmekapazität führen. Auch Konzentrationsverluste infolge von Instabilität der eingelagerten Moleküle gegenüber in den Kosmetika enthaltenen Chemikalien (z. B. Wasserstoffperoxid oder Ammoniak) können auftreten. Über eine deutliche Konzentrationsabnahme an Morphin, Monoacetylmorphin und Cocain nach Bleichung und Dauerwellenbehandlung von Haaren Drogenabhängiger berichteten Pötsch et al. [167]. Yegles et al. stellten bei Benzodiazepinen einen Verlust von ca. 60 % der eingelagerten Wirkstoffmenge nach Bleichung fest [168]. Kidwell et al. beschrieben die Umwandlung von Cocain zu Benzoylecgonin nach Haarwäsche mit basischem Shampoo [169]. Röhrich et al. stellten eine deutliche Abnahme der Drogenkonzentrationen im Haar nach einmaliger Anwendung eines Szene-Shampoos zur Drogenentfernung fest, wobei alle Drogen dennoch deutlich nachweisbar blieben [170]. Werden Haare starker Sonneneinstrahlung, Regen und Wind ausgesetzt, führt dies zu physikochemischer Alterung. Die bei der UV-Bestrahlung entstehenden Radikale lösen Lipidoxidationen, Veränderungen von Peptiden und einen Abbau von Melanin aus [144]. Skopp et al. beobachteten in Haarproben von Drogenkonsumenten nach dreimonatiger Exposition im Freien eine signifikante Verringerung der Morphin-, Monoacetyl- und Benzoylecgonin-Konzentrationen [171]. Weiterhin stellten sie nach 10 Wochen Sonnentextexposition im Vergleich zu im Dunkeln gelagerten Haaren eine Abnahme der THC-Konzentrationen um 50-90 % und der Cannabinol- sowie Cannabidiolgehalte fest [172].

2.3 Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)

Die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) ist eine in verschiedensten Bereichen der chemischen Analytik verwendete Methode der Probenvorbereitung, die sich sehr

gut mit der Kapillargaschromatographie in Kombination mit massenspektrometrischer Detektion koppeln lässt. Im Folgenden soll näher auf die Grundlagen dieser Methode eingegangen werden.

2.3.1 Funktionsprinzip und Aufbau der HS-SPME

Das Prinzip dieses lösungsmittelfreien Extraktionsverfahrens ist in Abb. 8 dargestellt und beruht auf der Verteilung der Analyten zwischen der Probe, die sich als flüssige oder feste Phase in einem verschlossenen Glasgefäß befindet, und dem Extraktionsmedium, das als Beschichtung auf eine Quarzglasfaser von ca. 0,3 mm Durchmesser und 15 mm Länge aufgebracht ist. Während des Extraktionsvorgangs befindet sich die beschichtete Faser im Dampfraum über der Probe. Zum Einstechen und Herausziehen in bzw. aus Probengefäßen oder der Injektionseinheit des Analysengerätes kann die Faser in eine Hohlneedle eingezogen werden, die sie vor Beschädigung und Kontamination schützt. Während der Extraktion bzw. der Desorption wird die Faser aus der Hohlneedle herausgeschoben.

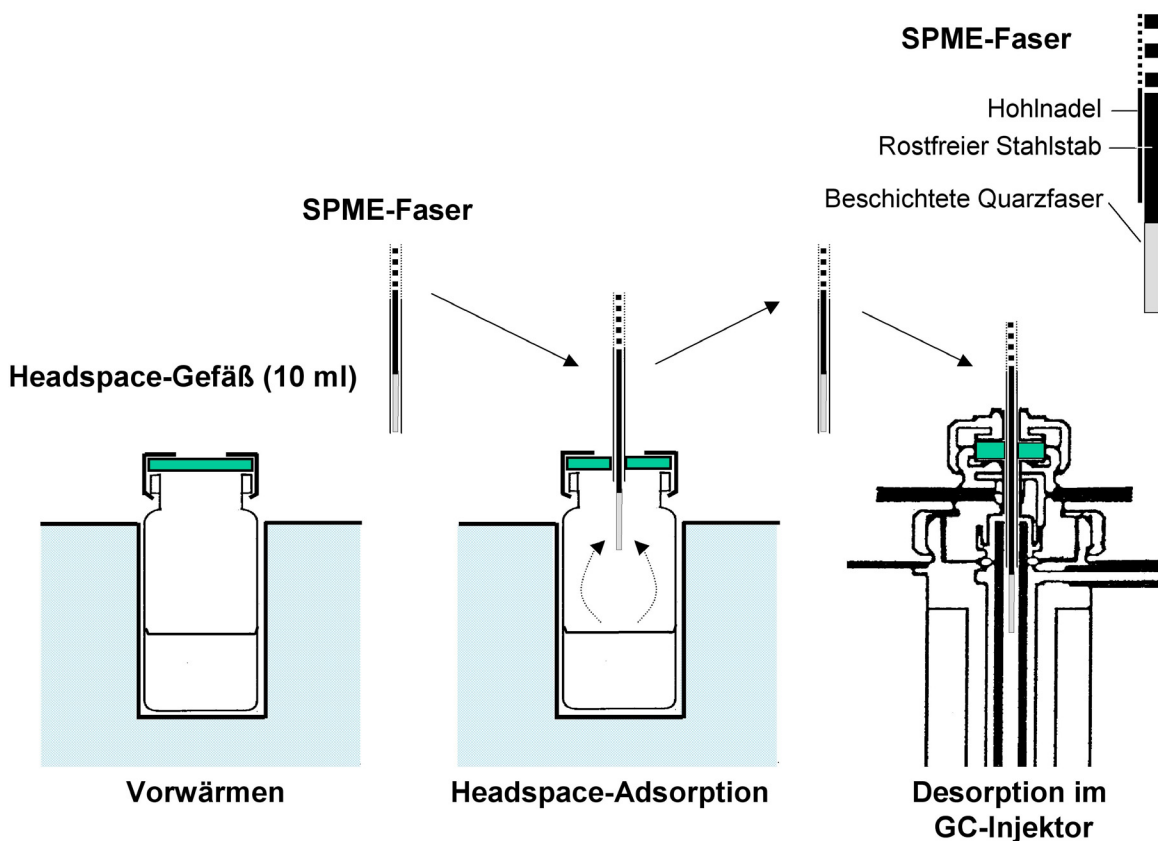


Abb. 8: Schematischer Ablauf der Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME).

Es sind Fasern mit unterschiedlichen polymeren Beschichtungsmaterialien kommerziell erhältlich. Man unterscheidet Fasern mit homogener Polymerschicht und solche mit heterogenem Aufbau der Beschichtung. Die Auswahl der Materialien und Dicke der Faserbeschichtung richtet sich nach den physikalisch-chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen. Für polare Substanzen sind Beschichtungen aus einem Polyacrylatpolymer (PA) oder Carbowax® geeignet. Eher unpolare Substanzen haben eine höhere Affinität zu Beschichtungen aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Es sind auch Mischphasen aus Carbowax® bzw. PDMS mit Divinylbenzol- oder Carboxen-Partikeln im Handel, die sich für einige Anwendungen als besonders geeignet erwiesen haben. Die Schichtdicken der Faserbeschichtungen variieren je nach Anwendung zwischen 7 und 100 µm [173], wobei für kleine, flüchtige Analyten bevorzugt dickere Schichten Verwendung finden. Analyten hoher Molekülmasse erfordern dünnere Schichtdicken, um Probleme durch verzögerte Desorption aus der Beschichtung zu vermeiden. In Tabelle 2 sind die zur Zeit erhältlichen Fasertypen mit den jeweils empfohlenen Einsatz- und Temperaturbereichen aufgelistet. Eine durch Abschätzen der Polarität, Flüchtigkeit und Molekülmasse

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche SPME-Fasern und deren Anwendungsbereiche.

Beschichtungsmaterial	Schichtdicke	Anwendung (Herstellerempfehlung)
PDMS	100 µm	GC/HPLC, flüchtige Verbindungen (MG 60-275)
PDMS	30 µm	GC/HPLC, unpolare semivolatile Stoffe (MG 80-500)
PDMS	7 µm	GC/HPLC, unpolare Verbindungen, hohe Molekülmasse (MG 125-600)
PA	85 µm	GC/HPLC, polare semivolatile Stoffe (MG 80-300)
PDMS/DVB	65 µm	GC, flüchtige Verbindungen, Amine, Nitroaromaten (MG 50-300)
PDMS/DVB	60 µm	nur für HPLC geeignet, Amine und polare Verbindungen
Carbowax/DVB	65 u. 70 µm	GC, Alkohole und polare Verbindungen (MG 40-275)
Carboxen/PDMS	75 u. 85 µm	GC, Gase, Verbindungen kleiner Molekülmasse (MG 30-225)
DVB/Carboxen	50/30 µm	GC, volatile und semivolatile Aromen und Duftstoffe (MG 40-275)
Carbowax/TPR-100	50 µm	nur für HPLC geeignet, oberflächenaktive Stoffe

des Analyten getroffene Vorauswahl sollte stets experimentell überprüft werden, da für viele Substanzen keine eindeutige Zuordnung getroffen werden kann und weitere experimentelle Parameter wie Extraktionstemperatur und Extraktionsdauer Einfluss auf die Extraktionsausbeuten und die Matrixbelastung des SPME-Extraktes haben können.

Findet die Desorption im Injektor eines Gaschromatographen statt, so wird die Faser durch das Inlet-Septum in den Injektoreinsatz aus Quarzglas (Liner) eingeführt, wo der Extrakt bei hoher Temperatur (üblicherweise $> 200^{\circ}\text{C}$) desorbiert wird.

Die Methode der HS-SPME erfordert keine aufwändige Probenvorbereitung und ermöglicht eine schnelle und reproduzierbare Probenverarbeitung durch Automatisierung (in dieser Arbeit mit Hilfe des in Abb. 9 dargestellten Probengebers MPS2 der Fa. Gerstel). Besonders interessant ist diese Methode für Analyten, die einerseits für statische Headspace-Methoden nicht genügend flüchtig sind, bei denen aber andererseits bei einer Lösungsmittlextraktion aufgrund des Dampfdruckes mit Substanzverlusten zu rechnen ist.

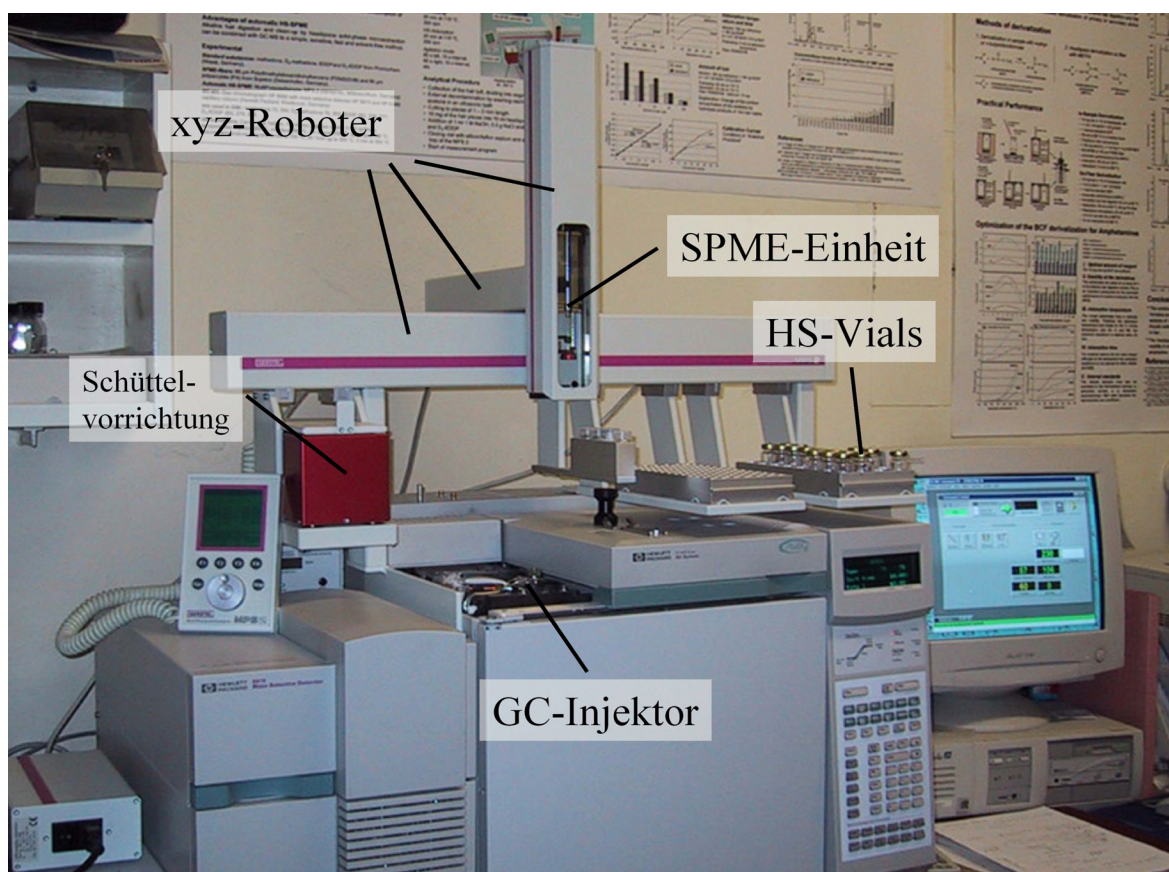


Abb. 9: Automatischer Probengeber MPS2 der Firma Gerstel. Der vertikale Arm des xyz-Roboters transportiert ein HS-Vial zunächst zur heizbaren Schüttelvorrichtung, in der die Extraktion stattfindet. Danach wird die SPME-Einheit über dem GC-Injektor positioniert, die SPME-Nadel in den Inlet eingestochen und die Faser zur Desorption aus der Führung geschoben.

Die Untersuchung sehr kleiner Probenmengen ist bei Verwendung von HS-SPME mit hoher Empfindlichkeit möglich, da die gesamte extrahierte Analytenmenge der Chromatographie zugeführt wird. Die Faser ist nach der Desorption sofort wieder gebrauchsfähig und hat eine Lebensdauer von bis zu 100 Einzelinjektionen. Da die Faser bei der HS-SPME nicht direkt in den Extrakt eintaucht, kann man die Probenvorbehandlung sehr variationsreich gestalten (z. B. den pH-Wert der Probe über große Bereiche variieren), ohne die Faser zu beschädigen.

Weitere Vorteile sind in der lösungsmittelfreien Arbeitsweise und der idealen Kombinierbarkeit mit GC-MS zu sehen. Nachteile des Verfahrens bestehen darin, dass Substanzen mit extrem niedrigem Dampfdruck und ionische Verbindungen nicht erfasst werden und dass keine vollständige Extraktion stattfindet.

2.3.2 Physikalische Grundlagen

Neben der Headspace-Variante kann die Extraktion mittels der beschichteten Faser auch direkt durch Eintauchen in die Probenlösung (Immersion) erfolgen. Dabei kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung der Konzentrationen in der Lösung und in der Faserbeschichtung. Für beide Varianten erhält man unter den bei der Herleitung der Gleichungen (1), (3) und (4) gemachten Annahmen dieselben Extraktionsausbeuten im Gleichgewichtszustand. Lediglich die Kinetik der Gleichgewichtseinstellung verändert sich. Die im Gleichgewicht von der Faser direkt aus der Lösung extrahierte Stoffmenge kann mit Hilfe von Gleichung (1) berechnet werden [173]. Bei der Herleitung von Gl. (1) wurden folgende Annahmen und Voraussetzungen gemacht:

- Die Matrix ist eine homogene Phase.
- Die thermische Ausdehnung der Polymere und die Änderung der Diffusionskoeffizienten durch Anwesenheit von Lösungsmittelresten im Polymer werden vernachlässigt.
- Es findet weder eine Adsorption an den Gefäßwänden noch ein thermischer oder biologischer Abbau des Analyten statt.
- Das Sorbens ist von konstanter Porosität.
- Gültigkeit des idealen Gasgesetzes.
- Es wird bis zur Einstellung des Gleichgewichts extrahiert.

$$n = \frac{K_{fp} \cdot V_f \cdot V_p \cdot c_0}{K_{fp} \cdot V_f + V_p} \quad (1)$$

mit n : Stoffmenge in der Faser

K_{fp} : Verteilungskoeffizient Faser/Probe

V_f : Volumen der Faser

V_p : Volumen der Probe

c_0 : Anfangskonzentration eines gegebenen Analyten in der Probe

Danach erhält man bei großem Verteilungskoeffizienten K_{fp} erwartungsgemäß eine hohe Extraktionsausbeute. Die Proportionalität zu c_0 bildet die Grundlage für die Quantifizierung (Linearität der Kalibrationskurve).

Gleichung (1) geht für große Probenvolumina ($K_{fp} \cdot V_f \ll V_p$) in Gl. (2) über, d. h. die extrahierte Stoffmenge ist direkt proportional der Probenkonzentration, dem Verteilungskoeffizienten K_{fp} und dem Volumen der Faser. Sie hängt nicht mehr vom Volumen der Probe ab:

$$n = K_{fp} \cdot V_f \cdot c_0 \quad (2)$$

Erfolgt die Extraktion über den Dampfraum, so lässt sich Gleichung (3) herleiten [173]:

$$n = \frac{K_{fh} \cdot K_{hp} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_p}{K_{fh} \cdot K_{hp} \cdot V_f + K_{hp} \cdot V_h + V_p} \quad (3)$$

mit n : von der Faser extrahierte Stoffmenge

K_{fh} : Verteilungskoeffizient Faser/Headspace

K_{hp} : Verteilungskoeffizient Headspace/Probe

V_h : Volumen des Headspace

V_f : Volumen der Faser

c_0 : Anfangskonzentration eines gegebenen Analyten in der Probe

V_p : Volumen der Probe

Setzt man in Gl. (3) für $K_{fh} \cdot K_{hp}$ den Verteilungskoeffizienten K_{fp} ein, was zulässig ist, wenn man den Dampfdruck des Lösungsmittels (meist H_2O) vernachlässigt, so erhält man Gleichung (4):

$$n = \frac{K_{fp} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_p}{K_{fp} \cdot V_f + K_{hp} \cdot V_h + V_p} \quad (4)$$

Die drei Terme im Nenner von Gl. (4) sind jeweils ein Maß für die Analyten-Aufnahmekapazität der entsprechenden Phase. Ist das Headspace-Volumen klein gegen das Probenvolumen ($V_h \ll V_p$), so geht Gl. (4) in Gl. (1) über, da auch K_{hp} für weniger flüchtige Analyten relativ klein ist. Da also Gl. (1) näherungsweise für SPME-Untersuchungen sowohl mit als auch ohne Headspace gilt, kann man für beide Verfahren sehr ähnliche Extraktionsausbeuten erwarten.

Der für die extrahierte Stoffmenge entscheidende Verteilungskoeffizient ist demnach K_{fp} . Wenn $K_{fp} > 1$ ist, was bei Auswahl eines für den Analyten geeigneten Faserbeschichtungsmaterials der Fall sein sollte, so ist der Transport des Analyten in die Faser ein exothermer Prozess. Nach Gl. (5) wird K_{fp} dann mit steigender Temperatur kleiner, eine Temperaturerhöhung wirkt sich demnach ungünstig auf die Extraktionsausbeute aus.

$$K_{fp} = K_0 \cdot \exp\left(\frac{\Delta H}{RT_0} + \frac{1}{T}\right) \quad (5)$$

mit K_0 : Verteilungskoeffizient bei Temperatur T_0

ΔH : molare Enthalpieänderung des Analyten bei Transport von der Probe in die Faser

Generell gilt, dass eine Temperaturerhöhung dazu führt, dass die Konzentration im Dampfraum steigt. Es hängt also im Einzelfall von der Temperaturabhängigkeit der Verteilungskoeffizienten K_{hp} und K_{fh} ab, bei welcher Temperatur die Extraktionsausbeute im Gleichgewicht ein Maximum durchläuft.

2.3.3 Experimentelle Parameter

Die wichtigsten experimentellen Parameter, die bei der HS-SPME optimiert werden können, sind neben der auf S. 29 bereits genannten **Faserauswahl** die **Extraktionstemperatur** und die **Extraktionsdauer**. Während über die Thermodynamik die Menge des im Gleichgewicht bei einer bestimmten Temperatur unter Verwendung einer bestimmten Faser extrahierten Analyten bestimmt werden kann, ist über kinetische Betrachtungen die Extraktionsausbeute bei einer Extraktionsdauer, die keine vollständige Gleichgewichtseinstellung erlaubt, nur grob abschätzbar. Die Berechnung würde das Lösen der den Stofftransport beschreibenden Differentialgleichungen erfordern, was in Unkenntnis der vielen Randbedingungen praktisch nicht möglich ist.

Ist das Headspace-Volumen nicht vernachlässigbar klein, wie es bei Herleitung von Gleichung (1) aus Gl. (4) angenommen wurde, so führt eine Erhöhung der Temperatur zu einer Änderung der Verteilungskoeffizienten zugunsten des Dampfraums, was mit einer Anreicherung des Analyten in demselben einhergeht und die Extraktionsausbeute zusätzlich zu der Verkleinerung von K_{fp} mit steigender Temperatur (Gl. (5)) erniedrigen kann, sofern die Konzentrationserhöhung in der Gasphase die Verkleinerung von K_{fh} nicht überkompensiert. Andererseits muss man Substanzen mit geringerer Flüchtigkeit bei erhöhter Temperatur extrahieren, um in einer möglichst kurzen Extraktionsdauer zu einer Gleichgewichtseinstellung zu gelangen, da eine zu lange Dauer der Extraktion zu einem geringen Probendurchsatz führt und Substanzverluste durch das Einstichloch im Septum beim Rühren auftreten können. Daher muss für jeden Analyten ein praktikabler Kompromiss gefunden werden, der mit Hilfe von Optimierungsexperimenten unter Bestimmung der Extraktionsausbeuten bei verschiedenen Temperaturen ermittelt werden kann.

In der Praxis ist man bei den meisten Anwendungen für Analyten mit geringerer Flüchtigkeit bestrebt, von einer möglichst hohen Temperatur auszugehen, um eine ausreichende Konzentration des Analyten im Dampfraum zu erhalten. Die maximale Extraktionstemperatur wird sowohl durch die Temperaturbeständigkeit der Faser und der Analyten als auch durch den Siedepunkt des Probenmediums begrenzt.

Systeme, die eine kontrollierte Kühlung der Faser erlauben, würden zwar durch die Möglichkeit der Anwendung hoher Extraktionstemperaturen ohne entsprechende Einbußen in der Extraktionsausbeute besonders gute Ergebnisse bei kurzen Extraktionszeiten liefern, sind aber technisch schwer zu realisieren und zur Zeit noch nicht kommerziell erhältlich. Zudem würde unter Faserkühlung die Selektivität der Extraktion geringer werden, da dann auch niedrig siedende Probenbestandteile in höherem Maße an der Faser adsorbiert würden.

Der **Zusatz von Neutralsalzen**, die im Probenmedium gut löslich sind (in wässrigem Medium z. B. NaCl oder Na₂SO₄), kann die Extraktionsausbeute erhöhen. Im Allgemeinen verstärkt sich dieser Aussalzeffekt mit zunehmender Polarität des Analyten. Er basiert auf der Erhöhung des Dampfdruckes des Analyten infolge einer Verkleinerung der Hydrathülle. Auch hier muss die optimale Salzart und -menge experimentell ermittelt werden.

Eine weitere Variable, welche die Extraktionsausbeute bei der SPME beeinflusst, besonders wenn es sich beim Analyten um eine protonierbare oder deprotonierbare Spezies handelt, ist der **pH-Wert** der Probe. Meist wählt man bei einer Säure einen pH-Wert, der

um mindestens zwei Einheiten unter dem pK_s -Wert der Säure liegt [173], sodass sie zum Großteil in der besser extrahierbaren Neutralform vorliegt. Bei Basen sollte der pH-Wert umgekehrt mindestens zwei pH-Einheiten über dem pK_s -Wert der protonierten Form liegen. Durch eine günstige Wahl des pH-Wertes können aber unter Berücksichtigung analoger Zusammenhänge auch gezielt basische oder saure Verunreinigungen in der Probe festgehalten und so von der Faser ferngehalten werden.

Die **Zusammensetzung des Probenmediums** wirkt sich wie die Faserauswahl auf die Größe des Verteilungskoeffizienten K_{fp} aus, der ein Maß für die maximal erreichbare Extraktionsausbeute ist. Zusatz von organischen Lösungsmitteln, wie er z. B. beim Dotieren der Probe mit in Ethanol oder Methanol gelösten inneren Standards auftritt, kann somit zu verminderter Extraktionsausbeute durch verbesserte Löslichkeit des Analyten in der Probe und Konkurrenz der im Headspace in hoher Konzentration vorliegenden Lösungsmittelmoleküle um die Adsorptionsstellen an der Faser führen. Daher sollte der Lösungsmittelanteil nach Möglichkeit unter 1 % des Probenvolumens betragen bzw. besser wässrige Lösungen des Standards verwendet werden.

Das **Verhältnis der Volumina** von Headspace und Probe spielt vor allem bei leichtflüchtigen Verbindungen eine Rolle. Bei Analyten mit geringerer Flüchtigkeit spielt das Volumenverhältnis aufgrund der kleinen Dampfdruckkonzentration (kleines K_{hp}) nur eine untergeordnete Rolle.

Auch die Art des Rührens oder Schüttelns (**Agitation**) während der Extraktion ist für die Dauer der Gleichgewichtseinstellung von Bedeutung. Dabei ist darauf zu achten, dass der Rührvorgang reproduzierbar durchgeführt wird, was am besten über eine Automatisierung des Prozesses zu realisieren ist. Bei direktem Eintauchen der Faser in die Probenlösung (Immersion) bewirkt die Agitation eine schnellere Gleichgewichtseinstellung, da der Konzentrationsgradient in der Grenzschicht Probe/Faser sich bei ständiger Durchmischung nur über eine kurze Distanz erstreckt. Bei der Headspace-Variante ist hingegen die Grenzschicht Probe/Headspace ausschlaggebend, auch hier baut sich ohne Agitation ein Konzentrationsgradient größerer Ausdehnung auf, der zu einem verlangsamten Stofftransport führt.

Die eingesetzte **Probenmenge** sollte so gewählt werden, dass eine Sättigung der Faser durch den Analyten oder andere Probenbestandteile vermieden wird, aber trotzdem eine ausreichende Empfindlichkeit erreicht werden kann.

Die Verwendung **innerer Standards** ist bei quantitativen Bestimmungen in biologischem Material unerlässlich. Der innere Standard sollte dem Analyten nach Möglichkeit strukturell nahe verwandt sein. Diese Forderung gilt bei der HS-SPME ganz besonders, da schon geringe Schwankungen in den experimentellen Bedingungen erhebliche Unterschiede in der Extraktionsausbeute strukturell verschiedener Substanzen bedingen können. Ideal ist die Verwendung entsprechender deuterierter Verbindungen.

Für die **Desorption** der Analyten von der Faser im GC-Inlet wählt man den Innendurchmesser des Liners nur wenig größer als den Außendurchmesser der verwendeten Faser, um einen schnellen Transport der Analyten durch den Trägergasstrom von der Faser über den Liner auf den Säulenkopf zu gewährleisten. Das Splitventil bleibt während der Desorption geschlossen, um Substanzverluste zu vermeiden. Die Temperatur wird dabei möglichst hoch gewählt, wobei die Obergrenze der Temperaturbelastbarkeit des Fasermaterials und eine eventuelle thermische Labilität des Analyten berücksichtigt werden müssen. Die Desorptionsdauer wählt man möglichst kurz, sie muss jedoch ausreichend lang sein, um eine vollständige Desorption zu gewährleisten, da sonst Empfindlichkeitsverluste auftreten können. In der Regel wird die Desorption mit der Regeneration der Faser für die nächste Messung verbunden. Eine unvollständige Desorption kann daher außerdem zur Verschleppung von Analyten führen.

Derivatisierungen können bei diesem Verfahren direkt in der Matrix (Extraktionsverhalten und Chromatographie des Analyten werden verändert) oder nach der Extraktion (nur das chromatographische Verhalten wird verändert) auf der Faser bzw. im Injektor durchgeführt werden. Bei Derivatisierung in der Probenmatrix ist die Auswahl der Reagenzien dadurch begrenzt, dass in wässrigen Proben nur mit hydrolysestabilen Derivatisierungsreagenzien (z. B. Chlorameisensäureester [174]) gearbeitet werden kann. Wenn der SPME-Extrakt auf der Faser derivatisiert wird, lassen sich zwei Vorgehensweisen unterscheiden. Zum einen die Derivatisierung nach der SPME-Extraktion durch Exponieren der Faser in dem mit Derivatisierungsreagenz gesättigten Dampfraum eines separaten Gefäßes (z. B. Acetylierung oder Silylierung) und zum anderen die Derivatisierung durch Eintauchen der Faser in ein möglichst wenig flüchtiges Derivatisierungsreagenz (z. B. Pyrenyldiazomethan [175]) vor der Extraktion mit schneller Umsetzung der Analyten an der Faser direkt nach dem Adsorptionsvorgang. Für die Derivatisierung im Injektor kommen vor allem Tetraalkylammoniumionen infrage, die durch Eintauchen in eine entsprechende Salzlösung auf die Faser gebracht werden können [176].

2.3.4 Anwendungsgebiete für HS-SPME

Die vielseitigen Anwendungen dieser Methode wurden von Pawliszyn in einer Monographie zusammengefasst [177]. Die Headspace-Festphasenmikroextraktion wird zur Lösung analytischer Probleme der Umwelt- und Lebensmittelchemie eingesetzt [178], findet aber auch für Fragestellungen der forensischen [179], klinischen [180] und pharmazeutischen Analytik [181] Anwendung.

Für HS-SPME sind auch relativ schwerflüchtige Analyten (semivolatile Verbindungen) geeignet, die mit einer statischen Headspace-Methode in der Regel nicht erfasst werden können. Die Methode schließt also die Lücke zwischen statischen Headspace-Methoden und der Injektion von gelösten Extrakten.

Besonders bieten sich Untersuchungen aus komplex zusammengesetzten Matrices mit HS-SPME an, da durch Auswahl einer SPME-Faser mit optimaler Selektivität die Belastung des Extraktes mit störenden Matrixkomponenten im Vergleich zu anderen Extraktionsverfahren sehr niedrig gehalten werden kann.

2.4 GC-MS und HPLC-DAD

Diese Methoden gehören seit vielen Jahren zum Standardrepertoire des Analytikers, daher soll an dieser Stelle lediglich auf Literatur verwiesen werden, in der diese Techniken ausführlich beschrieben sind.

Die Gaschromatographie (GC), insbesondere die Kapillargaschromatographie, ist eines der wichtigsten Trennverfahren in der chemischen Analytik. Ein ausführlicher Überblick über diese Methode ist z. B. in den Werken von Engewald [182] oder Otto [183] zu finden.

Die Massenspektrometrie (MS) zählt heute zu den wichtigsten Detektionsmethoden in Verbindung mit der GC, da sie bei Mitführen innerer Standards (z. B. deuterierter Analoga) zur hochempfindlichen und genauen quantitativen Bestimmung von Substanzen genutzt werden kann. Zusätzlich liefert sie Strukturinformationen zu unbekannten Komponenten, die in vielen Fällen auch bei Fehlen von Vergleichsspektren zu einer eindeutigen Zuordnung führen können. Die in der Praxis am häufigsten mit der GC gekoppelten Massenspektrometer arbeiten mit einem Quadrupol als Massenfilter, so auch die für diese Arbeit genutzten Systeme. Die Prinzipien der Massenspektrometrie wurden beispielsweise von Budzikiewicz [184] und DeHoffmann [185] ausführlich dargelegt, detaillierte Erläuterungen zur Interpretation von Massenspektren finden sich in einer Monographie von McLafferty [186].

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist eine leistungsfähige Trennmethode für polare organische Substanzen. Die wesentlichen Grundlagen, Prinzipien und praktischen Aspekte dieser Trennmethode wurden beispielsweise von Aced und Möckel [187] sowie von Meyer [188] ausführlich beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit kam eine Trennsäule mit einer stationären Phase aus alkyliertem Kieselgel zum Einsatz (RP-Phase). Bei dieser so genannten Umkehrphasen-Chromatographie wird als Laufmittel (mobile Phase) ein polares Solvens genutzt (z. B. eine wässrige Pufferlösung), dem nach Bedarf Anteile organischer Lösungsmittel oder andere Substanzen, sog. „Modifizier“, zugesetzt werden können.

Die Grundlagen der UV-Spektroskopie an organischen Molekülen werden in einschlägigen Lehrbüchern, z. B. von Skoog [189], beschrieben.

Die kontinuierliche Detektion des UV-Spektrums mittels eines Photodiodenarrays ist eine durch Einsatz von Computertechnik möglich gewordene Weiterentwicklung der bei fester oder variabler Wellenlänge arbeitenden UV-Detektoren und wird seit ca. 20 Jahren genutzt. Der Aufbau und die Funktionsweise eines Diodenarraydetektors (DAD) wird in einer Monographie von Huber und George beschrieben [190].

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Geräte

3.1.1 HS-SPME und GC-MS

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen kamen zwei GC-MSD-Systeme der Firma Agilent Technologies in der folgenden Konfiguration zum Einsatz:

1. Gaschromatograph HP 6890+, Massenselektiver Detektor HP 5973 MSD, Steuersoftware HP-Chemstation G1701BA Version B.00.00. Als Steuerrechner diente ein HP Vectra XA (Windows NT).
2. Gaschromatograph HP 6890N, Massenselektiver Detektor HP 5973N MSD, Steuersoftware HP-Chemstation G1701DA Version D.00.00.38. Als Steuerrechner diente eine Evo Workstation von Compaq (Windows 2000).

Beide Geräte waren mit einer chromatographischen Trennsäule des Typs HP-5ms (30 m Länge, Innendurchmesser 0,25 mm, Innenbeschichtung 0,25 μ m PDMS mit 5 % Phenylanteil) ausgestattet. Helium 5.0 diente als Trägergas.

Die verwendeten Septen (Thermogreen LB-2, vorgebohrt), die SPME-Insertliner (Innendurchmesser 0,75 mm) und die SPME-Fasern (PDMS/DVB, Schichtdicke 65 µm) wurden von Supelco (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Die Automatisierung der SPME-Extraktion wurde durch den Multi Purpose Sampler MPS2 (s. Abb. 9) der Firma Gerstel (Mühlheim/Ruhr, Deutschland) unter Verwendung der Software „cycle composer“ der Firma Chromtech GmbH (Idstein, Deutschland) realisiert.

3.1.2 HPLC-DAD

Die Bestimmungen des Squalengehaltes der Extrakte wurden mit einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu Europe GmbH (Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Sie bestand aus folgenden Komponenten: einer Pumpe des Typs LC-6A, einem Autosampler SIL-9A, einem Photodiodenarray-Detektor SPD-M10Avp und einem Steuerrechner (Standard IBM PC). Als Steuersoftware für den SPD-M10Avp wurde die Class-VP 5.032 bzw. LcSolution Version 1.02 SP2 verwendet.

Die Trennung wurde an einer Umkehrphasensäule für die HPLC des Typs Lichrospher-RP8ec, 5 µm, 250 x 4,0 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Acetonitril (UV grade) als mobiler Phase durchgeführt. Die mobile Phase wurde mit einem Vakuum-Degasser DG-1210 (Optilab Chromatographie Technik, Berlin, Deutschland) von gelöstem Gas befreit.

3.1.3 Geräte zur Probenvorbereitung

Für das Abdampfen von Lösungsmitteln und zum Erhitzen von Reaktionsmischungen wurde ein zwischen 30 und 120°C digital einstellbarer Metallblockthermostat/Evaporator der Firma Liebisch (Bielefeld, Deutschland), Type 2366-DA, mit N₂-Zufuhr über Multiplex-Ventildepot verwendet.

Kurze Schüttelvorgänge erfolgten mit einem Vortex-Rüttler VF2 der Firma Janke & Kunkel GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland). Zwischen 12 K unter Raumtemperatur und 99°C thermostatisiertes und zeitprogrammiertes Schütteln wurde mit dem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) mit speziell an die Gefäße angepasstem Wechselblock durchgeführt.

Zum Pulverisieren von Haarproben wurde eine Kugelmühle der Firma Retsch (Haan, Deutschland), Typ M 2000, verwendet. Für Ultraschallbehandlungen kam ein Sonorex Super RK 255 H der Firma Bandelin electronic (Berlin, Deutschland) zum Einsatz.

Außerdem wurden eine Zentrifuge Heraeus-Labofuge 400 der Firma Kendro Lab. Prod. (Osterode, Deutschland), ein Trockenschrank Typ UE 300 der Firma Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland), ein Mixer 5432 von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und ein pH-Meter Piccolo ATC der Firma Hanna Instruments (Kehl/Rhein, Deutschland) verwendet.

3.2 Chemikalien und Standardsubstanzen

3.2.1 Verwendete Chemikalien

Firma E. Merck: DMSO (> 99,7 %), n-Heptan (> 99 %), n-Hexan (> 99 %), NaCl (> 99,5 %), KH_2PO_4 (> 99 %), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Puffersubstanz), Ethylenglykol (> 99 %), Indolyl-3-essigsäure (> 99 %), Salzsäure rauchend 37 %, Acetonitril UV grade.

Firma Fluka: SOCl_2 (> 99 %) und Spülmittel zur Haarwäsche: 5 %ige Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS).

Firma Aldrich: 1-Phenyldodecan (97 %), $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$ (> 99 %), Squalen (97 %), Squalan (> 98 %), Natriummercaptopacetat (> 98 %).

5 β -Androstan-3,17-dion wurde vom Institut für Dopinganalytik und Sportchemie, Kreischa, zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Fettsäuren

Die kommerziell erhältlichen FSEE sowie die zur Synthese der übrigen FSEE und der deuterierten D_5 -FSEE verwendeten Fettsäuren sind in Tabelle 3 aufgeführt und wurden von der Firma Aldrich bezogen. Die hier eingeführten Abkürzungen werden auch im weiteren Text verwendet. Wenn es sich um deuterierte Ethylester handelt, wird der Abkürzung ein „ D_5 -“ vorangestellt.

3.2.3 Synthese und Reinheitsprüfung der FSEE und D_5 -FSEE

Die als Standardsubstanzen verwendeten Fettsäureethylester waren zum größten Teil nicht kommerziell erhältlich und mussten zunächst synthetisiert werden. Dazu wurde folgende Vorschrift verwendet [191].

Tabelle 3: Übersicht über die kommerziell erworbenen, in dieser Arbeit verwendeten Fettsäuren/Fettsäureethylester.

Fettsäure	Trivialname	Abkürzung ¹
11-Methyltridecansäure		aC14
12-Methyltridecansäure		iC14
Tetradecansäure	Myristinsäure	C14
cis-9-Tetradecensäure	Myristoleinsäure	C14 Δ^9
12-Methyltetradecansäure		aC15
13-Methyltetradecansäure		iC15
Pentadecansäure		C15
cis-10-Pentadecensäure		C15 Δ^{10}
13-Methylpentadecansäure		aC16
14-Methylpentadecansäure		iC16
Hexadecansäure	Palmitinsäure	C16
cis-9-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure	C16 Δ^9
14-Methylhexadecansäure		aC17
15-Methylhexadecansäure		iC17
Heptadecansäure	Margarinsäure	C17
cis-10-Heptadecensäure		C17 Δ^{10}
15-Methylheptadecansäure		aC18
16-Methylheptadecansäure		iC18
Octadecansäure	Stearinsäure	C18
cis-6-Octadecensäure		C18 Δ^6
cis-9-Octadecensäure	Ölsäure	C18 Δ^9
cis-13-Octadecensäure		C18 Δ^{13}
cis-15-Octadecensäure		C18 Δ^{15}
cis-9,12-Octadecadiensäure	Linolsäure	C18 $\Delta^{9,12}$
cis-6,9,12-Octadecatriensäure	γ -Linolensäure	C18 $\Delta^{6,9,12}$
17-Methyloctadecansäure		iC19
cis-10-Nonadecensäure		C19 Δ^{10}
18-Methylnonadecansäure		iC20
Eicosansäure	Arachinsäure	C20
cis-5-Eicosensäure		C20 Δ^5
cis-11-Eicosensäure		C20 Δ^{11}
cis-13-Eicosensäure		C20 Δ^{13}
cis-11,14-Eicosadiensäure		C20 $\Delta^{11,14}$
cis-8,11,17-Eicosatriensäure		C20 $\Delta^{8,11,17}$
cis-11,14,17-Eicosatriensäure		C20 $\Delta^{11,14,17}$

Fettsäureethylester	Trivialname	Abkürzung ¹
Tetradecansäureethylester	Myristinsäureethylester	C14-Et
Pentadecansäureethylester		C15-Et
Hexadecansäureethylester	Palmitinsäureethylester	C16-Et
Heptadecansäureethylester	Margarinsäureethylester	C17-Et
Octadecansäureethylester	Stearinsäureethylester	C18-Et
cis-9-Octadecensäureethylester	Ölsäureethylester	C18 Δ^9 -Et
cis-9,12,15-Octadecatriensäureethylester	Linolensäureethylester	C18 $\Delta^{9,12,15}$ -Et
Nonadecansäureethylester		C19-Et

¹ In den Abkürzungen folgt dem C jeweils die Zahl der Kohlenstoffatome, die in der Carbonsäure enthalten sind. Die Vorsätze i bzw. a bezeichnen die Isomere der Carbonsäure mit Methylverzweigung in Iso- bzw. Anteiso-Position, die hochgestellten Zahlen nach Δ geben die Position vorhandener Doppelbindungen an (immer cis). Ein angehängtes -Et bezeichnet den Ethylester der Fettsäure.

Es wurden zwischen 5 und 10 mg der jeweiligen Carbonsäure in ein zuvor ausgeheiztes und mit Schraubverschluss versehenes, 4 cm³ fassendes Glasgefäß eingewogen, in 20 µl Ethanol pro mg Säure gelöst und unter Verwendung eines PTFE-beschichteten Septums fest verschlossen. Nach Kühlen auf -15°C mittels einer Eis/Kochsalz-Mischung wurden 2 µl SOCl₂ pro mg Säure zugegeben. Unter wiederholtem Schütteln wurden die Reaktionsmischungen nun langsam auf Raumtemperatur gebracht und anschließend eine Stunde auf 40°C erwärmt. Die erhaltenen Emulsionen wurden unter Stickstoffstrom von überschüssigem C₂H₅OH, SOCl₂ und entstandenem HCl bzw. SO₂ befreit und zur vollständigen Entfernung dieser Bestandteile jeweils sechs mal in je 150 µl n-Hexan aufgenommen und erneut mit N₂ abgeblasen. Die Prüfung der Reaktionsprodukte auf Vollständigkeit der Umsetzung und Reinheit erfolgte jeweils durch Injektion von 1 µl einer verdünnten Lösung (100 µg/ml) in den Gaschromatographen und massenspektrometrischer Analyse im Full-Scan-Modus. Wenn keine Säure mehr nachzuweisen war, wurde von einer vollständigen Umsetzung (> 99 %) ausgegangen. War noch Edukt nachzuweisen, so wurde die Veresterungsreaktion wiederholt und das Produkt nochmals auf Reinheit untersucht. Die D₅-Fettsäureethylester wurden analog hergestellt, wobei C₂D₅OD anstelle von C₂H₅OH eingesetzt wurde.

In zwei Fällen waren nur die Ethylester, nicht aber die Säuren verfügbar. Die deuterierten Vergleichsverbindungen mussten daher in diesen Fällen aus den Ethylestern durch Umesterung hergestellt werden. Hierzu wurden je 10 mg Nonadecansäureethylester bzw. Linolensäureethylester in 100 µl D₆-Ethanol gelöst und nach Kühlung auf -15°C mit 0,5 µl konzentrierter Salzsäure versetzt. Unter wiederholtem Schütteln wurde die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur gebracht und 24 Stunden bei 40°C gehalten. Danach wurde wie bei der Synthese der FSEE verfahren. Die beiden erhaltenen Ester D₅ - C19-Et und D₅ - C18Δ^{9,12,15}-Et wurden mittels GC-MS auf noch vorhandenes Edukt untersucht. Die nicht deuterierten Ethylester waren jeweils mit etwa 10 % Anteil enthalten. Daher wurde die Umesterung mit dem Produktgemisch in gleicher Weise wiederholt. Bei anschließender Prüfung durch GC-MS betrug der undeuterte Anteil weniger als ein Prozent.

Von den in allen Fällen als Öl erhaltenen FSEE wurde je ca. 1 mg eingewogen und in Chloroform gelöst, sodass die Konzentration 1 mg/ml betrug. Dann wurden die Lösungen zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für Standardmischungen mehrerer FSEE wurden je

20 µl der 0,1 mg/ml Lösung der deuterierten Ester zusammengegeben und auf einen Milliliter aufgefüllt (Endkonzentration der Ester je 2 µg/ml).

3.2.4 Herstellung des Phosphatpuffers pH 7,6 nach Sørensen

3,52 g Kaliumdihydrogenphosphat und 9,1 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂O wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Dann wurde durch Zugabe von ca. 10 ml NaOH-Lösung (1 mol/l) auf pH 7,6 eingestellt (pH-Kontrolle mit pH-Meter).

3.2.5 Herstellung der Harnstoff/Mercaptoacetat-Lösung

120,12 g Harnstoff und 5,71 g Natriummercaptoacetat wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf 250 ml aufgefüllt.

3.3 Probengewinnung und Asservierung

Für die Durchführung dieser Untersuchungen lag ein Votum der Ethikkommission der Charité vor. Bei lebenden Probanden wurde nach einer mündlichen und schriftlichen Aufklärung das schriftliche Einverständnis eingeholt. Die Untersuchung der Haarproben von Todesfällen erfolgte im Rahmen der staatsanwaltschaftlichen Untersuchungsaufträge.

3.3.1 Haarproben

In der Regel wurde ein etwa bleistiftdickes Bündel Haare am Hinterkopf des Probanden zusammengebunden und so nahe wie möglich über der Kopfhaut (verbleibende Restlänge ca. 1 mm) mit einer Schere abgeschnitten. Die Lagerung bis zur weiteren Vorbereitung der Probe erfolgte nach Einwickeln in Aluminiumfolie und Verwahren in einem geschlossenen und beschrifteten Umschlag im Kühlschrank bei < 4°C.

Haarproben von Todesfällen wurden während der Obduktion im Institut für Rechtsmedizin der Charité Campus Mitte entnommen. Hierbei wurden zunächst Todesfälle ausgewählt, bei denen aus polizeilichen Ermittlungen, aus Aussagen Bekannter oder Verwandter bzw. der gesamten Auffindesituation möglichst eindeutig hervorging, dass es sich um starke Alkoholiker handelte. In den meisten Fällen wurde dies bei der Obduktion durch alkoholtypische Organveränderungen bestätigt. Zum direkten Vergleich wurden auch Haarproben von Verstorbenen ohne Verdacht auf Alkoholismus asserviert.

Die Haarproben von Normaltrinkern und Abstinenzlern bzw. Kindern stammen aus dem privaten Umfeld der Mitarbeiter des Instituts für Rechtsmedizin bzw. anderen Freiwilligen.

Zu jeder dieser Haarproben wurde ein Fragebogen ausgefüllt, auf dem Alter, Geschlecht, Haarfarbe, Trinkgewohnheiten und Besonderheiten der Haarpflege der jeweiligen Person erfasst wurden. Die Proben wurden zur Anonymisierung durchnummeriert und die entsprechenden Zusatzinformationen in einer Datei erfasst. Weitere Proben wurden im Zusammenhang mit medizinisch psychologischen Untersuchungen zur Überprüfung der Fahreignung analysiert. In Zusammenarbeit mit dem Evangelischen Krankenhaus Herzberge, Berlin, wurden außerdem insgesamt 29 Haarproben von Patienten in der stationären Entzugsbehandlung entnommen.

Aus 25 Alkoholikerhaarproben, die relativ hohe Mengen an FSEE enthielten, wurde ein Alkoholikerhaarpool erstellt, um ausreichend Probenmaterial konstanter Zusammensetzung zur Erarbeitung der analytischen Methode zu erhalten. Dafür wurden die vorgereinigten Haarproben nach Zurückbehalten von jeweils ca. 300 mg Haar für Einzeluntersuchungen mit einer Schere in 1-3 mm lange Stücke zerschnitten und anschließend vereinigt. Um einen homogenen Pool zu erhalten, wurden die so erhaltenen 26 g Haare in einem verschlossenen Schraubglas durch Schütteln und Umrühren intensiv vermischt.

Zur Herstellung eines Kinder-/Abstinenzlerhaarpools wurden vorher gewaschene, getrocknete und in 1-3 mm lange Stücke zerschnittene Haarproben von Kindern und Abstinenzlern, die niedrige FSEE-Konzentrationen zeigten, zu einem homogenen Haarpool vereinigt.

3.3.2 Wischproben

Ein Wattestäbchen aus 100 % Baumwolle („Bel nature“, Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland) wurde in n-Heptan getränkt und anschließend eine ca. 2 x 2 cm große Fläche auf der Stirn, dem Rücken oder dem Oberarm mit dem befeuchteten Wattestäbchen sorgfältig abgewischt (Abb. 10 links). Der Kopf des Wattestäbchens wurde dann in ein 4 ml fassendes, braunes Glasgefäß mit Schraubverschluss gebracht und ohne Berührung mit den Händen über der Gefäßkante vom Stiel abgebrochen. Das Gefäß wurde bis zum vollständigen Verdunsten des n-Heptans offen stehen gelassen und schließlich mit Septum und Schraubverschluss fest verschlossen. Die Lagerung bis zur Vorbereitung und Messung der Proben erfolgte im Kühlschrank bei $< 4^{\circ}\text{C}$.



Abb. 10: Durchführung eines Wischtests an der Stirn (linkes Bild) und Anbringen eines Pflasters (Drugs of Abuse Patch der Firma PharmCheck) am Oberarm (rechtes Bild).

3.3.3 Pflasterproben

Es wurden Pflaster („Drugs of Abuse Patch“) der Firma PharmCheck (Haltom City, Texas, USA) verwendet. Nachdem eine Stelle am Oberarm des Probanden zunächst mit n-Heptan entfettet und gereinigt worden war, wurde das Pflaster auf die vorbereitete Stelle gelegt und die Schutzfolie langsam und vorsichtig abgezogen, sodass die selbsthaftende Schutzfolie über dem Pflaster den Hautbereich um das Pflaster herum dicht abschloss (Abb. 10 rechts). Nach Ablauf der vorgesehenen Tragezeit wurde das Pflaster durch vorsichtiges Anheben und Ablösen der Schutzfolie vom Oberarm entfernt, zunächst in Aluminiumfolie und dann in einen beschrifteten Umschlag gepackt. Auch die Pflaster wurden bis zur Untersuchung bei einer Temperatur von $< 4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert.

3.4 Probenvorbereitungs- und Analysenmethoden

In diesem Abschnitt werden die endgültigen, nach Optimierung angewendeten Methoden beschrieben. Methodenentwicklung und -optimierung werden im Ergebnis- und Diskussionsteil dargestellt (Abschnitt 4.1).

3.4.1 Haare auf FSEE und Squalen

Reinigung und Zerkleinerung der Haarproben

Zur Reinigung wurden stark verschmutzte Haarproben zunächst in Wasser, das mit einigen Tropfen 5 %iger Dodecylsulfat-Lösung versetzt wurde, ca. 1 min lang intensiv gewaschen und mit warmem Wasser gut ausgespült. Bei extremer Verschmutzung der Haare bei Todesfällen wurde dieser Waschvorgang wiederholt, bis das Waschwasser keine Trübung mehr aufwies. Nach Vortrocknen mit einem Papierhandtuch wurde bei 35°C im Trockenschrank zwölf Stunden getrocknet. Danach wurden sie zur äußerlichen Entfettung zweimal mit n-Heptan gewaschen, falls die äußere Lipidschicht nicht untersucht wurde. Haarproben von lebenden Personen, die nicht verschmutzt waren, wurden nur mit n-Heptan entfettet. Anschließend wurden die Haarproben je nach Länge in Segmente geteilt und diese für die Analyse mit einer Schere in 1-3 mm lange Stücke zerschnitten.

Untersuchung der äußeren Lipidschicht

30 bis 50 mg der Haarprobe wurden in ein braunes, 4 ml fassendes Glasgefäß mit Schraubgewinde eingewogen, zweimal mit je 1 ml n-Heptan versetzt und nach Verschließen mit einem PTFE-beschichteten Septum und Schraubdeckel 1 min geschüttelt. Das n-Heptan wurde danach jeweils mit einer Pipette abgezogen und für die Analyse auf FSEE in einem 10 ml Headspace-Gefäß vereinigt. Nach Zugabe von je 40 ng der deuterierten Standards in 20 µl Chloroform wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen. Für die HS-SPME-Untersuchung wurden zum Rückstand 0,5 g NaCl und 1 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,6) gegeben und das Gefäß mit einer magnetischen Bördelkappe und einem PTFE-beschichtetem Septum verschlossen.

Extraktion der Haarprobe

Die vorbehandelte Haarprobe wurde nun mit 2 ml n-Heptan, 0,5 ml DMSO und je 40 ng der deuterierten Standards (D₅-FSEE) in 20 µl Chloroform versetzt und nach Verschließen mit einem teflonbeschichteten Septum und einem Schraubverschluss 15 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurden, falls eine Squalenbestimmung durchgeführt wurde, 500 µl der n-Heptan-Phase für die Squalenanalytik abgenommen und in ein Spitzvial überführt. Nach vollständigem Verdampfen des Lösungsmittels mittels Stickstoffstrom wurde der Rückstand in 50 µl Acetonitril aufgenommen. Hiervon wurden 10 µl in die HPLC-DAD-Anlage eingespritzt und nach der in Abschnitt 3.4.5 beschriebenen Methode auf Squalen unter-

sucht. Die verbliebenen 1,5 ml der n-Heptan-Phase wurden für die HS-SPME-Bestimmung der FSEE in ein 10 ml Headspace-Gefäß überführt und ebenfalls im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Dann wurden 0,5 g NaCl und 1 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,6) zugegeben und das Gefäß mittels einer magnetischen Bördelecke mit PTFE-beschichtetem Silikonseptum fest verschlossen.

Die in dieser Weise aufgearbeiteten Proben (Oberflächenlipide und Haarextrakte) wurden dann nach der in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen HS-SPME/GC-MS-Methode untersucht.

3.4.2 Wischproben

Zu der nach dem in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Verfahren gewonnenen Wischprobe (Wattestäbchenkopf) wurden in einem 4 ml Glasvial 2 ml n-Heptan gegeben. Nach 5-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurden 0,5 ml der Lipidlösung abgenommen und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde unter intensivem Schütteln in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Zur Bestimmung der Squalenkonzentration wurden 10 µl dieser Lösung in die HPLC-DAD-Anlage injiziert. Weitere 0,5 ml der Lösung wurden in ein 10 ml Headspace-Gefäß überführt, mit je 20 ng der deuterierten FSEE in 10 µl Chloroform versetzt und zur Trockne eingedampft. Anschließend wurden 0,5 g NaCl und 1 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,6) zugegeben. Mit einer magnetischen Bördelecke mit integriertem PTFE-beschichtetem Silikonseptum wurde das Gefäß nun fest verschlossen. Danach wurde die Probe nach der in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen HS-SPME/GC-MS-Methode auf FSEE untersucht.

Bei der Ablösung der Hautlipide war darauf zu achten, dass das n-Heptan nicht unnötig lange mit dem Wattestabkopf in Kontakt blieb, da sonst aus ungeklärter Ursache erhöhte FSEE-Konzentrationen gefunden wurden.

3.4.3 Pflasterproben

Ein ca. 6 x 6 mm großer Ausschnitt des Pflasters (Gesamtabsorptionsfläche ca. 3 x 4,5 cm) wurde mit einer Schere vom Pflaster abgetrennt und in ein 4 ml fassendes Glasvial mit Schraubverschluss gebracht. Nach Zugabe von 2 ml n-Heptan wurde 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wurden jeweils 500 µl des Extraktes für die Bestimmung der Squalenkonzentration bzw. der FSEE-Konzentrationen abgenommen. Die weitere Probenaufarbeitung verlief analog der in 3.4.2 beschriebenen Verfahrensweise für die Wischproben.

3.4.4 HS-SPME/GC-MS-Methode

3.4.4.1 HS-SPME

Die Probe wurde zunächst im Heizblock des MPS2 bei 90°C für 5 min temperiert. Dann wurde die Nadel mit der PDMS/DVB-Faser durch das Septum eingestochen und für 30 min bei 90°C unter Schütteln (abwechselnd 60 s mit 250 rpm Agitieren und 30 s Pause) exponiert. Nach Einziehen der Faser in die Hohnadel wurde die Nadel anschließend zum Injektorblock des Gaschromatographen bewegt und durch das Inlet-Septum eingestochen. Die Desorption erfolgte bei 250°C für 5 min. Während der folgenden gaschromatographischen Trennung und massenspektrometrischen Detektion der FSEE wurde bereits mit der Vorbereitung und Extraktion der nächsten Probe in der Sequenz begonnen.

3.4.4.2 GC-MS

Die GC-Säule wurde durchgängig mit einer Flussrate von 1 ml/min Helium betrieben (constant flow). Die GC-Injektionen erfolgten bei geschlossenem Splitventil (splitless), die Injektortemperatur betrug 260°C. 3 min nach Desorptionsbeginn wurde das Splitventil zur Spülung des Inlets mit einem Fluss von 30 ml/min geöffnet. Das folgende Temperaturprogramm wurde angewendet: 70°C für 3 min, mit 20 K/min auf 300°C, 5 min halten (Gesamtlauzeit GC: 18,5 min).

Die Temperatur der Ionenquelle betrug 230°C, die des Quadrupols 106°C und die des GC-MS-Interface 280°C. Die Ionisierungsenergie der Ionenquelle lag bei 70 eV, die Elektronenmultiplier-Spannung 200 mV über der nach Autotune eingestellten Spannung. Ein Autotune wurde mindestens einmal pro Woche durchgeführt.

Die unter diesen Bedingungen eingestellten Retentionszeitfenster und die m/z-Werte, die im Selected Ion Mode (SIM) zur Detektion der FSEE verwendet wurden, sind in Tabelle 4 dargestellt. Zur quantitativen Auswertung wurde das Verhältnis der Peakflächen für die in Tabelle 4 fett gedruckten m/z-Werte (jeweils die m/z-Werte des einfach geladenen Molekülions) des undeuterten zu denen des entsprechenden deuterierten Fettsäureethylesters herangezogen. Für den überwiegenden Teil der Untersuchungen wurde die Analyse auf die vier in der höchsten Konzentration vorkommenden FSEE (Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat) beschränkt und nur die zu diesen Estern gehörigen Ionenspuren aufgezeichnet. Die Kalibration und die Validierung der Methode sind in Abschnitt 4.1.5.1 beschrieben.

Tabelle 4: SIM-Zeitfenster und zur Detektion der FSEE verwendete m/z-Werte.

SIM-Zeitfenster bei 28 m Säulenlänge	Detektierte Massenspuren (m/z, SIM-Modus)*	Zugrundeliegende Fettsäuren (Abk. vgl. Tabelle 3)
8,9 bis 9,55 min	157 (162), 256 (261) 254 (259)	C14, iC14, aC14 C14 Δ^9
9,55 bis 10,1 min	157 (162), 270 (275)	C15, iC15, aC15
10,1 bis 10,5 min	157 (162), 284 (289) 282 (287)	C16, iC16, aC16 C16 Δ^9
10,5 bis 11,05 min	157 (162), 298 (303) 296 (301)	C17, iC17, aC17 C17 Δ^{10}
11,05 bis 11,5 min	157 (162), 312 (317) 264, 265, 310 (315) 263, 308 (313) 261, 306 (311)	C18, iC18, aC18 C18 Δ^6 , C18 Δ^9 , C18 Δ^{13} , C18 Δ^{15} C18 $\Delta^{9,12}$ C18 $\Delta^{6,9,12}$, C18 $\Delta^{9,12,15}$
11,5 bis 11,9 min	157 (162), 326 (331) 236, 324 (329)	C19, iC19 C19 Δ^{10}
11,9 bis 14 min	157 (162), 340 (345) 250, 338 (343) 245, 336 (341) 236, 334 (339)	C20, iC20 C20 Δ^5 , C20 Δ^{11} , C20 Δ^{13} C20 $\Delta^{11,14}$ C20 $\Delta^{11,14,17}$, C20 $\Delta^{8,11,17}$
* Die Massen der deuterierten FSEE (D ₅ -FSEE) sind, falls sie sich von denen der nicht deuterierten FSEE unterscheiden, jeweils in Klammern angegeben. Die fett gedruckten m/z-Werte wurden zur Quantifizierung herangezogen.		

3.4.5 HPLC-DAD-Methode

Das Laufmittel (100 % Acetonitril) wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min im Kreislauf geführt. Die Detektion des Squalens erfolgte nach Trennung auf einer RP8-Säule bei einer Retentionszeit von ca. 6 min. Für die Peakidentifikation wurde zusätzlich das UV-Spektrum genutzt. Zur quantitativen Auswertung wurde die Absorption bei 208 nm herangezogen. Die Kalibration und die Validierung dieser Methode sind in Abschnitt 4.1.5.2 beschrieben.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Entwicklung der analytischen Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit GC-MS für die quantitative Bestimmung von FSEE angewandt, nachdem vorherige Versuche, FSEE in Haaren nach Flüssigextraktion und SPE mit anschließender GC-MS nachzuweisen, nicht zu den erforderlichen Nachweisgrenzen geführt haben [134]. Durch die Anreicherung der Analyten an einer SPME-Faser über dem Dampfraum der Probe war zu erwarten, dass nur noch ein Bruchteil vor allem der schwereren oder polaren im Extrakt enthaltenen Lipide mitextrahiert würden und es so zu einer Anreicherung der lipophilen FSEE käme. In allen zur Entwicklung und Optimierung der Methode zur FSEE-Bestimmung durchgeführten Experimenten wurden die vier Ester Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat gemessen.

Außerdem wurde eine schnelle und robuste HPLC-DAD-Methode zur quantitativen Bestimmung von Squalen aus Hautoberflächen- und aus Haarlipiden entwickelt.

4.1.1 Vorbehandlung und Lagerung der Haarproben

In der Haaranalytik kommt der Vorbehandlung im Sinne des Entferns äußerer Anhaftungen sowie der Lagerung der Proben generell eine große Bedeutung zu. Ohne einen vor der Extraktion ausgeführten Waschvorgang kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Analyten selbst oder analytisch störende Substanzen aus äußeren Quellen auf das Haar gebracht wurden und das Ergebnis verfälschen. Dies kann absichtlich (man kann auf einschlägigen Seiten im Internet z. B. Shampoos bestellen, deren Anwendung den Nachweis von Betäubungsmitteln im Haar gezielt stören soll), aber auch unabsichtlich, beispielsweise durch Behandlung mit Haarkosmetika oder Kontamination durch Stäube, Rauch oder andere äußere Einflüsse geschehen.

Die sachgemäße Lagerung der Haarproben ist von Bedeutung, da unter Einwirkung von Licht, Wärme oder Feuchtigkeit empfindliche Analyten nach und nach durch Hydrolyse oder Oxidation zerstört werden können, wenn eine zeitnahe Messung nach der Probenahme nicht möglich ist oder asservierte Proben nachträglich untersucht werden sollen.

4.1.1.1 Waschen und äußerliches Entfetten der Haarproben

Um die Voraussetzungen für eine hohe Messempfindlichkeit und eine Vergleichbarkeit von FSEE-Konzentrationen in Haarextrakten zu schaffen, musste ausgeschlossen werden, dass auf der Haaroberfläche haftende Ethylester mit erfasst werden oder die Messung durch andere Kontaminationen gestört wird. Daher wurden die Haarproben der Todesfälle und stark verschmutzte Proben zunächst mit einer Tensidlösung (Dodecylsulfat in H₂O) gewaschen und getrocknet. Alle Haarproben wurden vor der eigentlichen Extraktion äußerlich mit n-Heptan entfettet. In einigen Fällen wurden die so erhaltenen n-Heptan-Lösungen parallel zum Haarextrakt auf FSEE untersucht, um Aufschluss über deren Einlagerungsweg ins Haar zu erhalten. Wie in Abschnitt 4.2.1 gezeigt wird, erwies sich diese äußere Dekontamination als sehr wichtig, da die in der äußeren Haarlipidschicht gefundenen FSEE-Mengen zum Teil die in der Haarmatrix gefundenen bei weitem überstiegen. Versuche zur Klärung des Einflusses wiederholter Haarwäschen mit einem handelsüblichen Shampoo auf die Menge der extrahierten FSEE wurden ebenfalls durchgeführt und werden in Abschnitt 4.3.2.7 im Zusammenhang mit den Einflussgrößen auf die FSEE-Konzentrationen im Haar beschrieben.

4.1.1.2 Lagerung der Haarproben

Die zu untersuchenden Proben wurden grundsätzlich in Aluminiumfolie eingewickelt und bei < 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen konnte auch nach Ablauf von 4 Monaten bei erneuter Extraktion und Messung von 3 jeweils in Doppelbestimmung untersuchten Haarproben von Lebenden keine Verminderung des FSEE-Gehaltes festgestellt werden.

Wiederholte Messungen an zwei individuellen Proben von Todesfällen (Probe 1 und Probe 2 in Tabelle 5) und einem Alkoholikerhaarpool nach Lagerung bei Raumtemperatur in einem Glasgefäß über 5 Monate zeigten jedoch, dass unter diesen Bedingungen eine deutliche Abnahme der FSEE-Konzentrationen auftreten kann (vgl. Tabelle 5). Bei dem Haarpool, der aus nur mit Tensidlösung gewaschenem Haar von Todesfällen mit vermutetem Alkoholabusus zusammengestellt worden war, kam es innerhalb dieses Zeitraumes zu einer Abnahme der FSEE-Konzentrationsumme auf 62 % des Ausgangswertes. Wahrscheinlich ist diese Abnahme auf Hydrolyse der Ester durch Feuchtigkeitsreste im Haar und Autoxidation, in erster Linie aber auf den mikrobiellen Befall einzelner Leichenhaar-

Tabelle 5: Verminderung der FSEE-Konzentrationen im Haar bei längerer Lagerung bei Raumtemperatur.

		Ethylmyristat [ng/mg]	Ethylpalmitat [ng/mg]	Ethyloleat [ng/mg]	Ethylstearat [ng/mg]	Summe FSEE [ng/mg]
Probe 1	1. Mess-zeitpunkt	0,03	0,16	0,09	0,03	0,31
	5 Monate später	0,01	0,08	0,05	0,02	0,15
Probe 2	1. Mess-zeitpunkt	0,14	1,31	2,76	0,37	4,57
	5 Monate später	0,03	0,47	0,74	0,18	1,42
Alkoholiker-haarpool	1. Mess-zeitpunkt	0,09	0,54	0,58	0,15	1,36
	5 Monate später	0,05	0,37	0,31	0,10	0,83

proben, die dem Pool zugemischt wurden, zurückzuführen. In den anderen beiden untersuchten Fällen reduzierte sich die Konzentrationssumme auf 50 bzw. 31 % des Ausgangswertes, wobei die Probe mit der höheren Ausgangskonzentration, die von einem extremen Alkoholiker stammte, einen stärkeren relativen Rückgang zeigte.

Es empfiehlt sich daher, Haarproben von Todesfällen möglichst zeitnah zur Probenentnahme zu analysieren. Falls das nicht möglich ist, sollten die Proben bis zur Analyse vor Feuchtigkeit geschützt und tiefgekühlt gelagert werden, um eine starke Reduzierung des FSEE-Gehalts infolge von Bakterienbefall und Hydrolyse zu vermeiden.

4.1.2 Extraktion der FSEE aus dem Haar

Eine alkalische Hydrolyse der Haare vor der Extraktion, wie sie für den Nachweis einer Vielzahl anderer Verbindungen mit gutem Erfolg durchgeführt werden kann [192-194], kam aufgrund der im Basischen instabilen Esterbindung nicht in Betracht. Auch auf eine enzymatische Auflösung des Haars musste wegen der Gefahr der Esterspaltung verzichtet werden. Zunächst wurde daher der HS-SPME eine Fest/Flüssig-Extraktion der Haare vorangestellt. Ein für diesen Schritt geeignetes Extraktionsmittel muss zum einen die Fähigkeit besitzen, Haare zu quellen, um die Diffusion der FSEE aus dem Haar heraus zu beschleunigen, zum anderen muss es sich durch ein gutes Lösungsvermögen für die Analyten auszeichnen. Schließlich darf es nicht mit den FSEE reagieren. Zum Quellen des

Haares sind protische Lösungsmittel wie z. B. Wasser, Methanol, Ethylenglykol aber auch DMSO als aprotisches Solvens geeignet, da sie die Fähigkeit besitzen, unter Volumenzunahme des Haares und Auflockerung der Haarstruktur in das Haar einzudringen [144]. Zum Lösen der Fettsäureethylester sind im Gegensatz dazu nur relativ unpolare Lösungsmittel wie Heptan, Chloroform oder CH_2Cl_2 etc. geeignet. Alkohole wie Methanol und Ethanol besitzen zwar sowohl ein Quellvermögen für Haare als auch ein gewisses Lösevermögen für lipophile Substanzen, jedoch haben Vorversuche gezeigt, dass es bei Verwendung von Methanol oder Ethanol zur Esterbildung oder Umesterung kommen kann [134]. Eine weitere Voraussetzung ist, dass das Lösungsmittel anschließend unter milden Bedingungen wieder entfernt werden kann. Daher bot es sich an, ein zweiphasiges Lösungsmittelgemisch bestehend aus einem polaren, in die Haarstruktur eindringenden und einem unpolaren, leicht verdampfbaren Lösungsmittel zu verwenden. Nach diesen Vorüberlegungen wurden einige zweiphasige Lösungsmittelsysteme auf ihre Eignung als Extraktionsmittel untersucht. Für die Extraktion wurden 50 mg des Alkoholikerhaarpools mit den zweiphasigen Gemischen in Glasgefäßen bei Raumtemperatur für 22 h geschüttelt, die unpolare Lösungsmittelphase abgetrennt und nach Eindampfen und Zugabe von 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,6) und 0,5 g Kochsalz mit der in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen HS-SPME/GC-MS-Methode untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 angegeben. Ein Gemisch aus DMSO und n-Heptan stellte sich als das effektivste Extraktionsmittel heraus. Bei der zusätzlich erprobten Verwendung von Chloroform oder Dichlormethan statt n-Heptan als Lösemittel verschlechterte sich der chromatographische Untergrund deutlich, ohne dass höhere Extraktionsausbeuten erzielt wurden. In den weiteren Versuchen kam deshalb ein Gemisch aus 2 ml n-Heptan als Lösemittel und 0,5 ml DMSO als Quellmittel zum Einsatz.

Tabelle 6: Relative Ausbeuten der Extraktion von Fettsäureethylestern aus einem Alkoholikerhaarpool.

Bei der Extraktion verwendetes Extraktionsgemisch	Relative Extraktionsausbeute in % (Durchschnitt aller vier FSEE)
0,5 ml DMSO + 2 ml n-Heptan	100
0,5 ml 8-M Harnstoff / 0,2-M Mercaptoacetat-Lösung + 2 ml n-Heptan	98
0,5 ml Ethylenglykol:Puffer (pH 7,6) = 1:1 + 2 ml n-Heptan	71
0,5 ml Ethylenglykol + 2 ml n-Heptan	64
0,5 ml Puffer (pH 7,6) + 2 ml n-Heptan	47

Durch Mehrfachextraktion von Haarproben wurden die absoluten Extraktionsausbeuten bei Verwendung dieses Extraktionsgemisches ermittelt. Dazu wurden die Haarproben nach der ersten Extraktion und vollständiger Abtrennung der Heptanphase erneut mit 2 ml n-Heptan überschichtet und für 22 h geschüttelt. Die zweite Extraktion lieferte Werte, die im Mittel nur noch ca. 4 % der Werte für die erste Extraktion betrugen. Nach einem dritten Extraktionsschritt konnten keine FSEE mehr im Extrakt nachgewiesen werden. Es ergaben sich somit absolute Extraktionsausbeuten von > 90 % für alle untersuchten Fettsäureethylester. Um den zeitlichen Verlauf der Extraktion zu klären, wurden in einer weiteren Versuchsreihe jeweils 50 mg Alkoholikerhaarpool für eine Dauer zwischen 3 und 24 h mit dem n-Heptan/DMSO-Gemisch extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 graphisch dargestellt. Für das Ethylpalmitat war die Extraktion bereits nach ca. 6 h vollständig, für die anderen Ester war ein weiterer Anstieg der Konzentrationen zu verzeichnen, bis nach ca. 12 Stunden ein Plateau erreicht wurde. Für die praktische Anwendung der Methode wurde eine Extraktionsdauer von 15 h festgelegt.

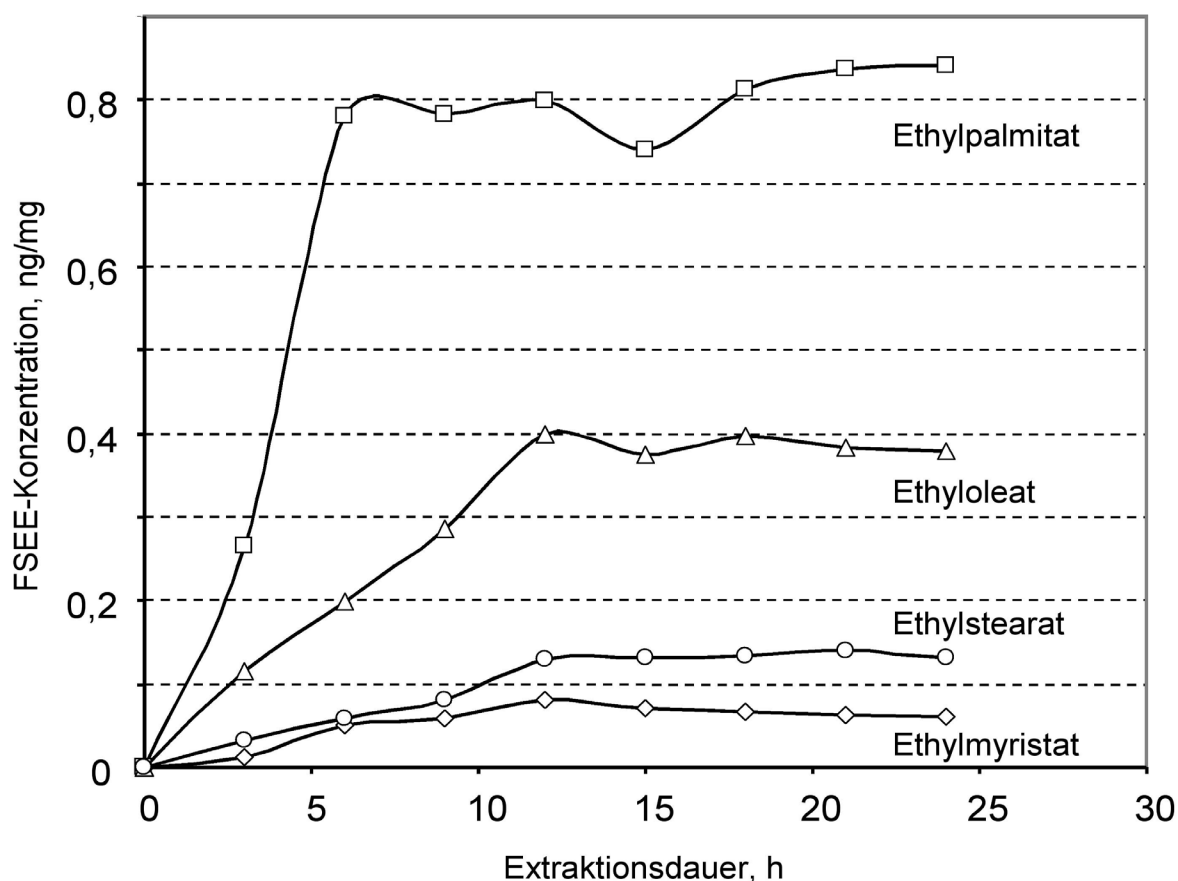


Abb. 11: Einfluss der Extraktionsdauer auf die im n-Heptan/DMSO-Extrakt gemessene FSEE-Konzentration. Es wurden jeweils 50 mg Alkoholikerhaarpool mit 0,5 ml DMSO und 2 ml n-Heptan extrahiert und Doppelbestimmungen durchgeführt.

Auf Ultraschallbehandlung wurde vollständig verzichtet, da Vorversuche ergeben hatten, dass es durch die im Haar befindliche Restfeuchtigkeit in Verbindung mit den hohen Temperaturen, die bei Ultraschall lokal entstehen können, zu verstärkter Hydrolyse der Ester kommen kann. Zudem konnten im Chromatogramm eine wesentliche Erhöhung des Grundrauschens und eine erhöhte Zahl störender Matrix-Peaks beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden beim Mahlen der Haare mit einer Kugelmühle gemacht. Als Extraktionsgefäße wurden ausschließlich Glasgefäße mit Schraubverschluss und teflonbeschichteten Septen verwendet, da sich im Laufe der Untersuchungen herausgestellt hatte, dass aus den zunächst verwendeten Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss bei der Extraktion neben Weichmachern und Oligomeren, die ein erhebliches Grundrauschen erzeugten, auch Substanzen herausgelöst wurden, die in Abstinenzlerhaarproben einen positiven Befund für alle vier FSEE, vor allem aber für Ethylstearat, vortäuschten. Aufgrund der starken Matrixbelastung und der kaum auswertbaren resultierenden Signale konnte nicht endgültig geklärt werden, ob es sich hierbei wirklich um diese Verbindungen gehandelt hat. Dies erscheint aber eher unwahrscheinlich.

Um dieses mehrere Aufarbeitungsschritte umfassende und relativ aufwändige Verfahren zu vereinfachen, wurde in weiteren Experimenten überprüft, ob die FSEE auch ohne den vorgeschalteten Extraktionsschritt durch HS-SPME direkt aus dem Haar extrahierbar sind. Dazu wurde zunächst eine Menge von ca. 30 mg Haar und je 40 ng der deuterierten FSEE in 20 µl DMSO in ein 10 ml HS-Gefäß gegeben und nur unter Zusatz der HS-SPME-Probenflüssigkeit (s. S. 58f) mit einer PDMS/DVB-Faser extrahiert und mit GC-MS analysiert. Bei Anwendung dieses „direkten“ HS-SPME-Verfahrens gelangten zwar sowohl FSEE aus dem Haar als auch deuterierte Standards an die Faser und konnten anschließend mittels GC-MS detektiert werden, die Reproduzierbarkeit der quantitativen Ergebnisse war aber unter diesen Bedingungen nicht zufrieden stellend (Standardabweichungen von bis zu 40 %). Der Zusatz verschiedener Reagenzien (Ethylenglykol, Harnstoff-Lösung mit und ohne Zusatz von Thioglykolsäure) in das Headspace-Gefäß mit dem Ziel, ein Quellen der Haare zu bewirken und eine einheitliche Oberfläche der Probenflüssigkeit und reproduzierbarere Diffusionsverhältnisse zu schaffen, brachte in dieser Hinsicht zwar eine Verbesserung, die Standardabweichung für 10 Einzelmessungen eines Alkoholikerhaarpools blieb aber mit über 10 % weiterhin unbefriedigend. Um die quantitativen Ergebnisse der Kurzmethode (K) mit den Ergebnissen bei Verwendung der Methode mit vorhergehender

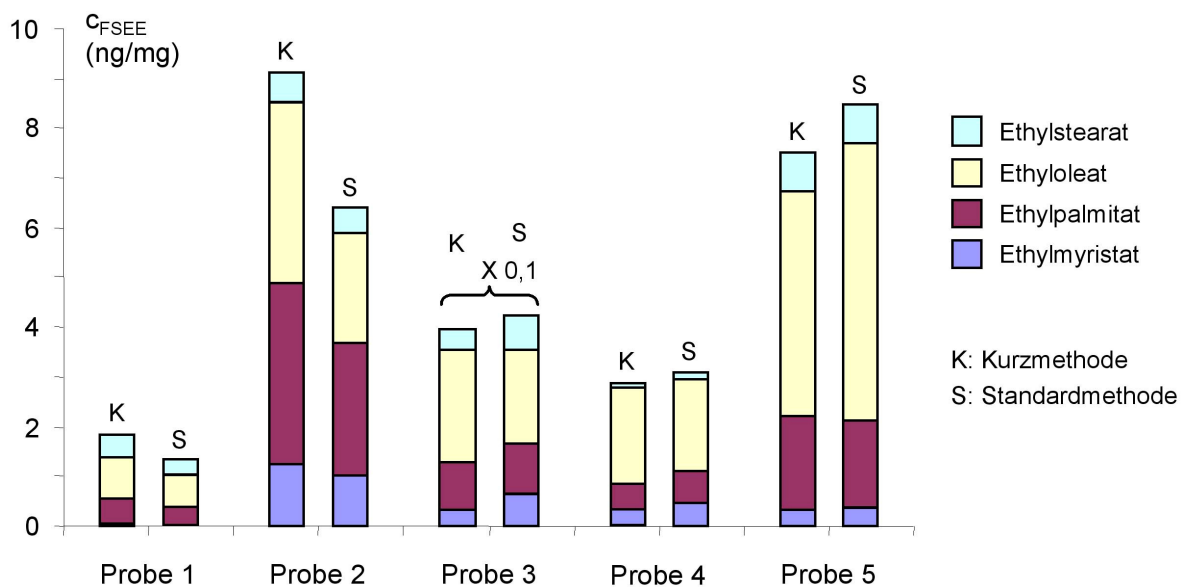


Abb. 12: Vergleich der mit der Kurzmethode (30 mg Haare + 40 ng D₅-FSEE in 20 µl DMSO + 0,5 g NaCl + 1 ml Phosphatpuffer pH 7,6 in 10 ml Headspace-Gefäß direkt mit HS-SPME extrahiert; HS-SPME/GC-MS-Methode s. Abschnitt 3.4.4) und nach Vorextraktion mit zweiphasigem Extraktionsmittel (Standardmethode, s. Abschnitt 3.4.1) erhaltenen quantitativen FSEE-Werte im Haar.

Extraktion (S: Standardmethode) zu vergleichen, wurden 5 Todesfallhaarproben mit beiden Methoden jeweils in Doppelbestimmung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 wiedergegeben. Es ergaben sich deutlich voneinander abweichende Ergebnisse, wobei unter Verwendung der Kurzmethode in zwei Fällen (Probe 1 und 2) deutlich höhere, in den anderen 3 Fällen (Probe 3-5) dagegen etwas niedrigere Konzentrationssummen gefunden wurden. der Hauptgrund für die erniedrigten Werte liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit in der relativ langsamen Diffusion der FSEE aus dem Haar, die dazu führt, dass sich bei Ende der 30-minütigen HS-SPME-Extraktion das Verteilungsgleichgewicht für die undeuterten FSEE noch nicht vollständig eingestellt hat. Eine Erklärung für die erhöhten Werte kann in dem Entweichen der deuterierten inneren Standards (D₅-FSEE), die vor Abschluss des Diffusionsprozesses der FSEE aus dem Haar einen überproportionalen Dampfdruck im Dampfraum des Probengefäßes haben, durch das von der SPME-Nadel angestochene Septum gesehen werden (vgl. hierzu Abschnitt 4.1.3.2 und 4.1.3.3). Im Einzelfall kann das Wechselspiel dieser beiden Faktoren in Abhängigkeit von individuellen Eigenschaften der jeweiligen Haarprobe zu einer erniedrigten oder auch zu einer erhöhten FSEE-Konzentration führen. Weitere Versuche, die ein längeres Einweichen der Haare in einem fest verschlossenen Gefäß bei erhöhter Temperatur vor der HS-SPME-Extraktion sowie eine Erhöhung der Extraktionsdauer umfassten, wurden wegen mangelnder Reproduzierbarkeit

der quantitativen Ergebnisse abgebrochen. Somit erwies sich diese verkürzte Methode für quantitative FSEE-Bestimmungen als ungeeignet.

Bei der favorisierten Vorextraktion der Haare mit dem zweiphasigen Extraktionsmittel erreicht man vor der HS-SPME-Extraktion bereits eine gleichmäßige Verteilung des deuterierten inneren Standards in der Probenlösung, sodass derartige Probleme ausgeschlossen werden können. Allerdings muss dafür ein erhöhter Aufwand bei der Probenvorbereitung in Kauf genommen werden.

4.1.3 Erstellung und Optimierung der HS-SPME-Methode

Der gesamte Extraktionsvorgang muss so auf die zu erfassenden Substanzen abgestimmt sein, dass diese möglichst vollständig aus der Haarmatrix in das Extraktionsmedium (SPME-Faser) übergehen, wobei eine gleichzeitige Extraktion störender Matrixbestandteile möglichst nur in geringem Umfang stattfinden soll. Da die in 4.1.2 beschriebene Vorextraktion des Haars mit einem DMSO/n-Heptan-Gemisch alle mobilisierbaren Lipide im Haar erfasst, musste dies von der HS-SPME-Methode geleistet werden.

Bei allen Optimierungsversuchen für die HS-SPME wurde auf den Zusatz deuterierter Standards verzichtet, da hier nur die absoluten Signalintensitäten wichtig sind. In allen Versuchen außer denen zur Auswahl des Faserbeschichtungsmaterials wurde eine PDMS/DVB-beschichtete Faser eingesetzt, die HS-SPME-Extraktion wurde mit einem automatischen Probengeber (MPS2, Firma Gerstel) durchgeführt.

Die zu optimierenden Parameter bei der HS-SPME umfassen die Zusammensetzung der Probenflüssigkeit (pH-Wert, Salzzusatz), die Extraktionstemperatur, die Extraktionsdauer, die Auswahl des Faserbeschichtungsmaterials und ggf. dessen Schichtdicke, die Rührgeschwindigkeit sowie die Desorptionsdauer und -temperatur.

4.1.3.1 Zusammensetzung der Probenflüssigkeit

Bei allen Optimierungsexperimenten wurde zu dem nach Eindampfen der Heptanphase des DMSO/n-Heptan-Haarextraktes erhaltenen Rückstand 1 ml Phosphatpuffer pH 7,6 gegeben, um eine definierte flüssige Oberfläche zu erhalten, auf der ein sich ständig erneuernder Lipidfilm dafür sorgt, dass sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen flüssiger Phase und SPME-Faser über den Dampfraum zügig einstellen kann. Ohne Zusatz von Pufferlösung wurden generell niedrigere absolute Peakflächen bei verschlechterter Reproduzierbarkeit erhalten. Der pH-Wert (7,6) wurde schwach alkalisch gewählt, um die im

Extrakt in großer Menge vorhandenen freien Fettsäuren ($pK_s \approx 5$) als Carboxylate in der flüssigen Phase zu binden, ohne Gefahr zu laufen, die FSEE alkalisch zu hydrolysieren. Da ein Salzzusatz zur flüssigen Phase bei der HS-SPME häufig zu einem erhöhten Dampfdruck der Analyten im Dampfraum und somit zu einer erhöhten Extraktionsausbeute führt, wurde in einer Reihe von Versuchen der Einfluss verschiedener Salzzusätze untersucht. Hierzu wurden zunächst in Abwesenheit von Haarextrakt jeweils 1 ml Phosphatpuffer und 0,5 g des entsprechenden Salzes zu den FSEE gegeben, wobei ein Teil des Salzes ungelöst als Bodenkörper zurückblieb. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt und lassen erkennen, dass wider Erwarten ohne Salzzusatz die höchsten Peakflächen erhalten werden. Bei der Untersuchung von Haarextrakten statt der reinen Referenzsubstanzen stellte sich jedoch heraus, dass bei Anwesenheit von Salzen höhere, zumindest aber gleich hohe Flächen gefunden werden wie ohne Salzzusatz. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Salzzusätzen sind vergleichsweise gering ausgeprägt, wie das bei sehr unpolaren Analyten zu erwarten ist (vgl. Abschnitt 2.3.3). Die Zugabe von NaCl lieferte im Vergleich mit den anderen Salzzusätzen die höchste Extraktionsausbeute. Daher wurde in allen weiteren Untersuchungen mit einem Zusatz von 0,5 g NaCl gearbeitet.

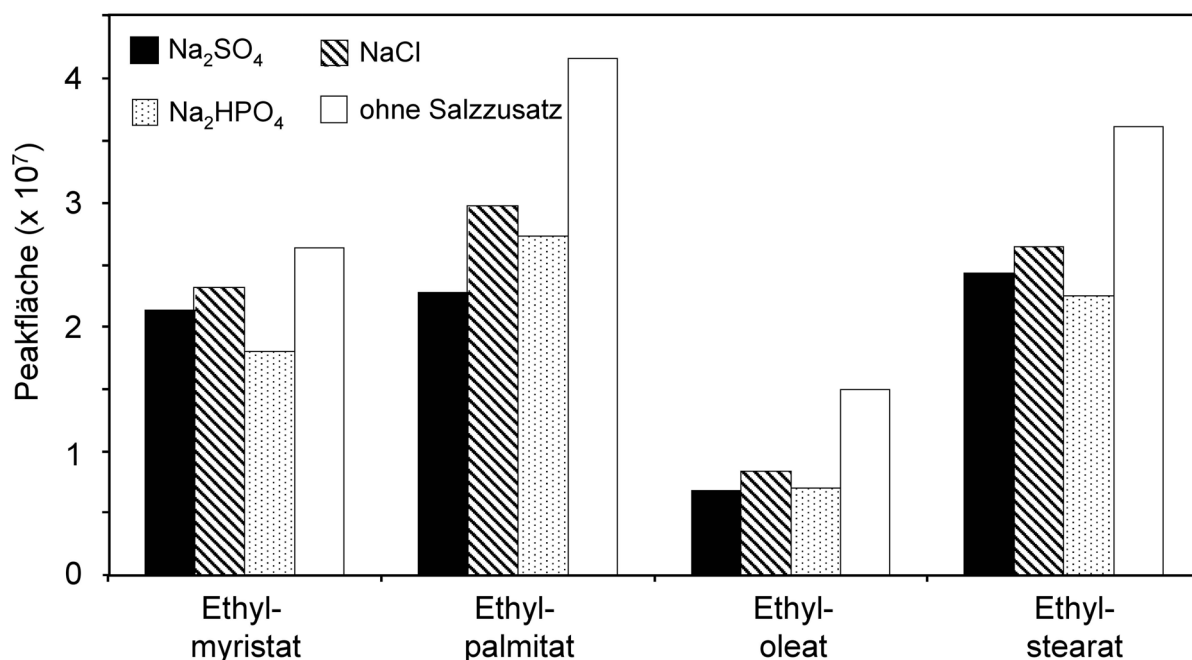


Abb. 13: Einfluss des zugesetzten Salzes (jeweils 0,5 g) auf die GC-MS-Peakflächen von Fettsäureethylestern bei der HS-SPME in Abwesenheit von Haarmatrixbestandteilen. Extraktionstemperatur 100°C, Extraktionsdauer 30 min. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.1.3.2 Optimierung der Extraktionstemperatur

Um die Extraktionstemperatur zu optimieren, wurden jeweils 100 ng der vier untersuchten FSEE mit 0,5 g Na_2SO_4 und 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,6) versetzt und mit der in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen HS-SPME/GC-MS-Methode untersucht. In Abb. 14 sind die absoluten Flächen unter den Peaks der jeweiligen Molmassenspuren gegen die Extraktionstemperatur aufgetragen. Die Extraktionsdauer wurde konstant auf 30 min gehalten. Im Bereich zwischen 40 und 100°C führte eine Temperaturerhöhung bei allen vier Verbindungen zu einer Erhöhung der Extraktionsausbeuten, wobei Ethyloleat und Ethylstearat erst ab ca. 60°C extrahiert wurden. Ab ca. 100°C war nur noch ein geringer Anstieg bzw. für Ethylmyristat sogar eine Erniedrigung der Peakflächen zu verzeichnen. Gleichzeitig wurde mit steigender Temperatur vor allem oberhalb von 100°C die Reproduzierbarkeit stark beeinträchtigt. Sowohl für die verschlechterte Reproduzierbarkeit als auch für die Erniedrigung der Peakfläche des Ethylmyristats bei Temperaturen oberhalb 100°C sind vermutlich Substanzverluste durch das angestochene Septum verantwortlich. Diese Verluste fallen für Ethylmyristat aufgrund der im Vergleich zu den länger-kettigen Estern relativ hohen Dampfdruckkonzentration am stärksten ins Gewicht und überkompensieren einen positiven Effekt der Temperaturerhöhung, wie er bei den anderen Estern beobachtet werden kann. Daher wurden in der Messmethode 90°C als Extraktionstemperatur festgelegt.

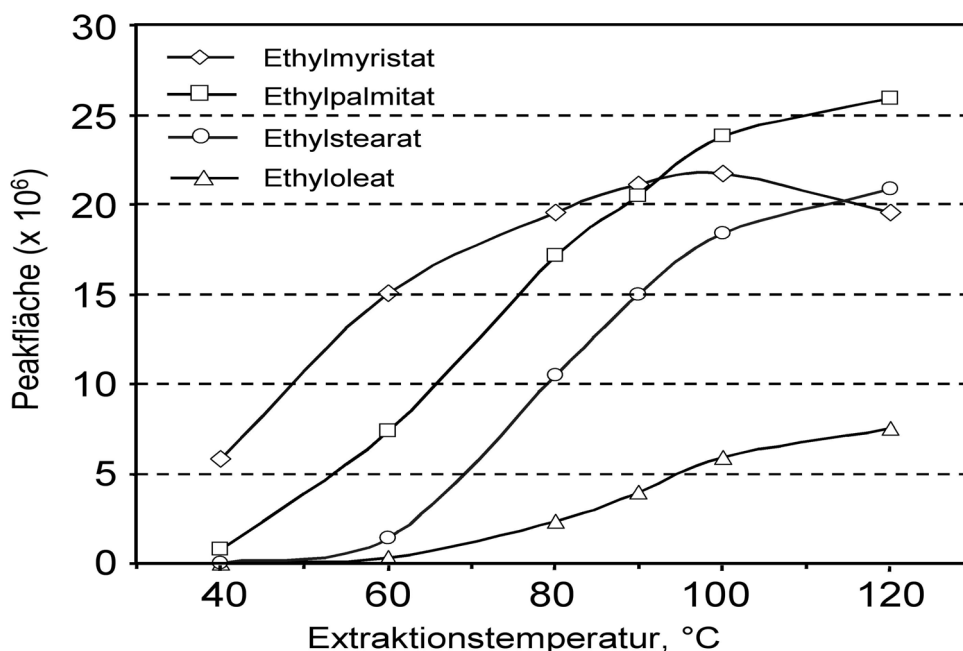


Abb. 14: Abhängigkeit der GC-MS-Peakflächen von der SPME-Extraktionstemperatur bei konstanter Extraktionsdauer von 30 min. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.1.3.3 Optimierung der Extraktionsdauer

Zur Optimierung der Extraktionsdauer wurden je 100 ng der vier Ester nach Zugabe von 0,5 g Na_2SO_4 und 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,6) bei einer konstant gehaltenen Extraktionstemperatur von 100°C zwischen 10 und 60 min lang extrahiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt. Für alle vier untersuchten FSEE wurde nach ca. 30 min das Verteilungsgleichgewicht zwischen flüssiger Phase und SPME-Faser erreicht. Eine weitere Verlängerung der Extraktionsdauer führte zu einer leichten Erniedrigung der Extraktionsausbeuten. Dies resultiert zum einen aus Substanzverlusten durch die Einstichstelle im Septum und zum anderen aus hydrolytischer Zersetzung der Ester. Um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten, sollte die Extraktionsdauer als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der automatisierten SPME nach Möglichkeit kurz gehalten werden. Andererseits ist ein Abbruch der Extraktion vor Erreichen des Verteilungsgleichgewichts mit einer erniedrigten Empfindlichkeit durch verminderte Extraktionsausbeuten und einer geringeren Reproduzierbarkeit verbunden, vor allem im Bereich starker Steigung der Extraktionsausbeute gegen die Extraktionsdauer. In der Methode für die FSEE-Konzentrationsbestimmungen aus Haarextrakten wurde daher eine Extraktionsdauer von 30 min festgelegt.

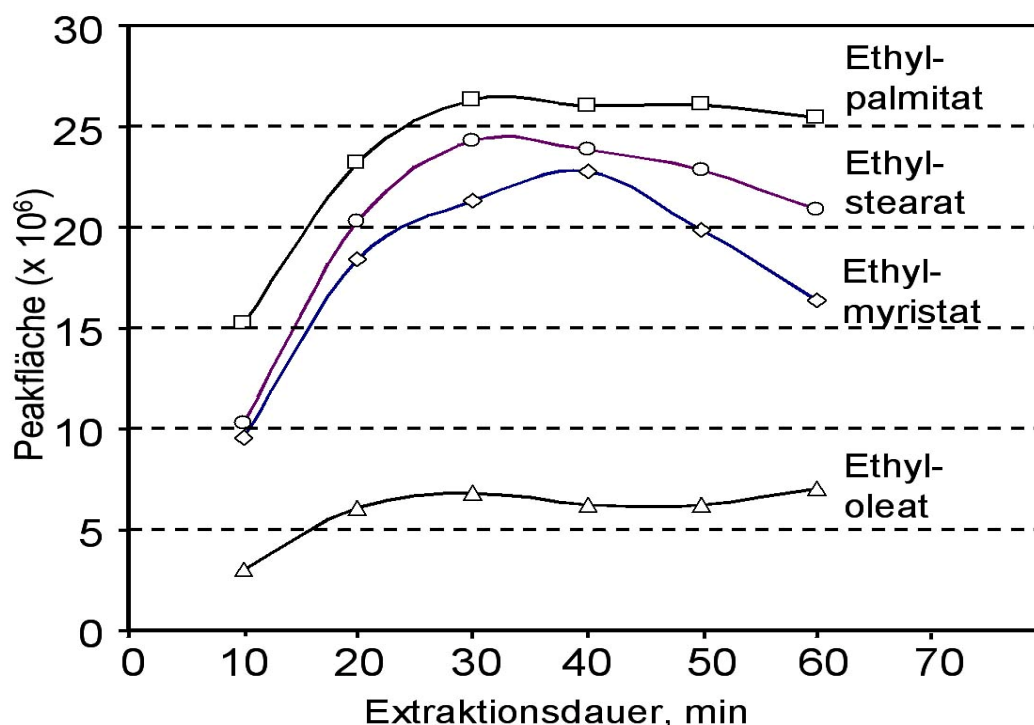


Abb. 15: Abhängigkeit der GC-MS-Peakflächen von der Extraktionsdauer bei konstanter Extraktionstemperatur von 100°C . Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.1.3.4 Auswahl des Faserbeschichtungsmaterials

Bei der Faserwahl müssen grundsätzlich zwei Faktoren in Betracht gezogen werden: zum einen die Polarität des Analyten und zum anderen seine Flüchtigkeit und Molekülgröße. Üblicherweise wählt man zunächst ein Beschichtungsmaterial, das eine ähnliche Polarität wie der Analyt aufweist. Die Filmdicke wählt man mit steigender Molekülmasse tendenziell dünner, um Verschleppungseffekte durch langsamere Diffusionsgeschwindigkeiten im Faserinneren für größere Analyten zu vermeiden. Große Beschichtungsvolumina bewirken durch die erhöhte Aufnahmekapazität eine effektive Extraktion flüchtiger Substanzen.

Nach den Herstellerangaben und durch Vergleich mit vorher publizierten Ergebnissen bezüglich anderer, ähnlich unpolarer Analyten erschienen als Faserbeschichtungsmaterial entweder PDMS/DVB (65 μm) oder reines PDMS (30 μm) als besonders geeignet. Faserbeschichtungen aus Polyacrylat oder auf Carbowax[®]-Basis kamen aufgrund ihrer hohen Polarität weniger in Betracht. Die PDMS/DVB-Faser kombiniert als bipolare Faser eine hohe Lipophilie der quasiflüssigen PDMS-Schicht, in der sich die schwach polaren FSEE sehr gut lösen, mit einem DVB-Anteil, der in Form poröser Partikel eingearbeitet ist und zusätzliche Adsorptionsstellen zur Verfügung stellt.

In Abb. 16 sind die Ergebnisse der experimentellen Überprüfung verschiedener Faserbeschichtungsmaterialien hinsichtlich ihrer Eignung zur Extraktion von FSEE aus einem Haarextrakt dargestellt. Dazu wurden zunächst mehrere Haarproben extrahiert, die Extrakte vereinigt und zu gleichen Teilen in HS-Gefäße gebracht. Alle Messungen wurden am selben Tag in Doppelbestimmung durchgeführt, um Flächenschwankungen, die durch

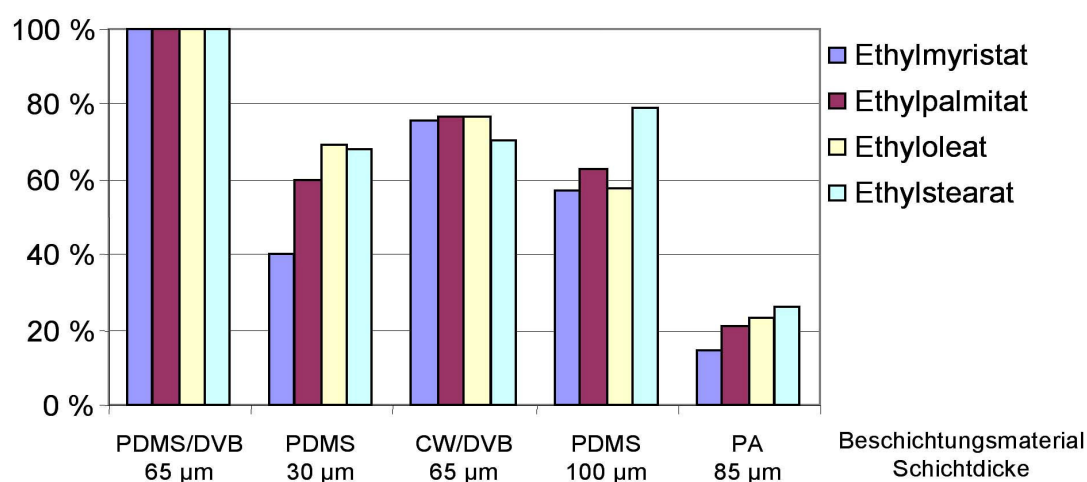


Abb. 16: Relative HS-SPME-Extraktionsausbeuten für FSEE aus Haarextrakt bei Verwendung verschiedener Faserbeschichtungsmaterialien (Extraktionsausbeute für PDMS/DVB = 100 %).

den Zustand der Ionenquelle, die MS-Tuning-Parameter oder die Chromatographie bedingt sein könnten, nach Möglichkeit klein zu halten. Im direkten Vergleich der PDMS/DVB-Faser (65 μm) mit der PDMS-Faser (30 μm) stellte sich heraus, dass mit der reinen PDMS-Faser für alle vier FSEE nur < 70 % der Extraktionsausbeuten, die bei Verwendung der PDMS/DVB-Faser erhalten wurden, erreicht werden konnten. Die zusätzlichen Adsorptionsstellen an den DVB-Partikeln wirken sich dabei besonders günstig auf die leichteren FSEE aus, die bei Verwendung der 30 μm PDMS-Faser nur eine relative Extraktionsausbeute von 40 % erreichten. Eine Erhöhung der Beschichtungsdicke auf 100 μm PDMS resultierte zwar in einer leichten Erhöhung der relativen Extraktionsausbeuten (< 80 % bezogen auf PDMS/DVB, 65 μm), ist aber auch mit einer erhöhten Verschleppungsgefahr durch verlangsamte Desorption vor allem der schwereren FSEE verbunden. Die polaren Fasermaterialien lieferten erwartungsgemäß ebenfalls deutlich reduzierte relative Extraktionsausbeuten, wobei die Carbowax[®]-basierte Faser (CW/DVB, 65 μm) durch den Anteil an DVB-Partikeln im Vergleich zu der reinen Polyacrylat-Faser (PA, 85 μm) deutlich bessere Ergebnisse lieferte (CW/DVB um 80 %, PA < 30 %). Im Ergebnis wurde die PDMS/DVB-Faser für die Routinemessungen gewählt.

4.1.3.5 Einfluss der Desorptionsdauer

Die Desorptionsdauer muss ausreichend lang gewählt werden, um eine vollständige Desorption des SPME-Extrakts zu gewährleisten, da sonst mit Verschleppung gerechnet werden muss. Andererseits soll die Analysendauer nicht durch eine unnötig lange Desorption verlängert werden, um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten. Die Hitze- einwirkung im Injektorblock kann zudem die Lebensdauer der Faser verkürzen. Eine Desorptionsdauer von 5 min erwies sich in dieser Hinsicht als praktikabler Kompromiss.

4.1.3.6 Einfluss der Probenmenge auf die HS-SPME-Extraktionsausbeute

In früheren Untersuchungen von Sporkert und Pragst wurde festgestellt, dass die absolute Extraktionsausbeute bei der HS-SPME mit steigender Probenmenge sinkt [194,195]. Im Falle der FSEE, bei denen nur der Lipidextrakt statt des ganzen alkalisch hydrolysierten Haars analysiert wird, konnte derselbe Effekt beobachtet werden. In einer Versuchsreihe wurden 0, 10, 20, 50 und 100 mg eines Abstinenzlerhaarpools mit je 40 ng der vier undeuterten FSEE in 20 μl CHCl_3 versetzt und nach dem Standardverfahren (Abschnitt 3.4.1) extrahiert. Die Untersuchung der Extrakte mit der in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen

HS-SPME/GC-MS-Methode und Vergleich der erhaltenen Peakflächen mit der bei Direktein-spritzung der gleichen Menge FSEE erhaltenen Flächen ergab die in Abb. 17 dargestellten absoluten Extraktionsausbeuten. Danach wurden bei Einsatz einer Haarmenge von 5 mg die höchsten HS-SPME-Extraktionsausbeuten erzielt (32-39 %). Weitere Erhöhung der Haarmenge führte zu einem Abfall der Extraktionsausbeute auf Werte zwischen 5 und 10 % bei einer Haarmenge von 100 mg. Als Erklärung für diese Beobachtung können im Haarextrakt enthaltene oberflächenaktive Substanzen, die zu einer verbesserten Löslichkeit der FSEE in der flüssigen Phase und damit einem kleineren Verteilungskoeffizienten für das Verteilungsgleichgewicht zwischen Faser und der flüssigen Phase führen, herangezogen werden. Eine andere Erklärung wären Sättigungs- und Verdrängungseffekte auf der Faser durch andere koextrahierte, im GC-MS-SIM nicht erfasste Probenbestandteile. Dass ohne Haarextrakt etwas niedrigere Extraktionsausbeuten gefunden werden als bei Verwendung von 5 oder 10 mg Haar, liegt wahrscheinlich an Adsorptionseffekten an der Glasoberfläche des Headspace-Gefäßes oder am schnelleren Verdampfen der FSEE im Stickstoffstrom bei Abwesenheit schwerflüchtiger Haarlipide, in die sie sonst nach Verdampfen des n-Heptans eingebettet sind. Für die routinemäßige Analyse von Haarproben auf FSEE wurden 30-50 mg Haar eingesetzt, da so eine akzeptable Extraktionsausbeute auf der einen Seite und eine ausreichend große Menge Analyt auf der anderen Seite zu einem guten Signal-Rausch-Verhältnis führen.

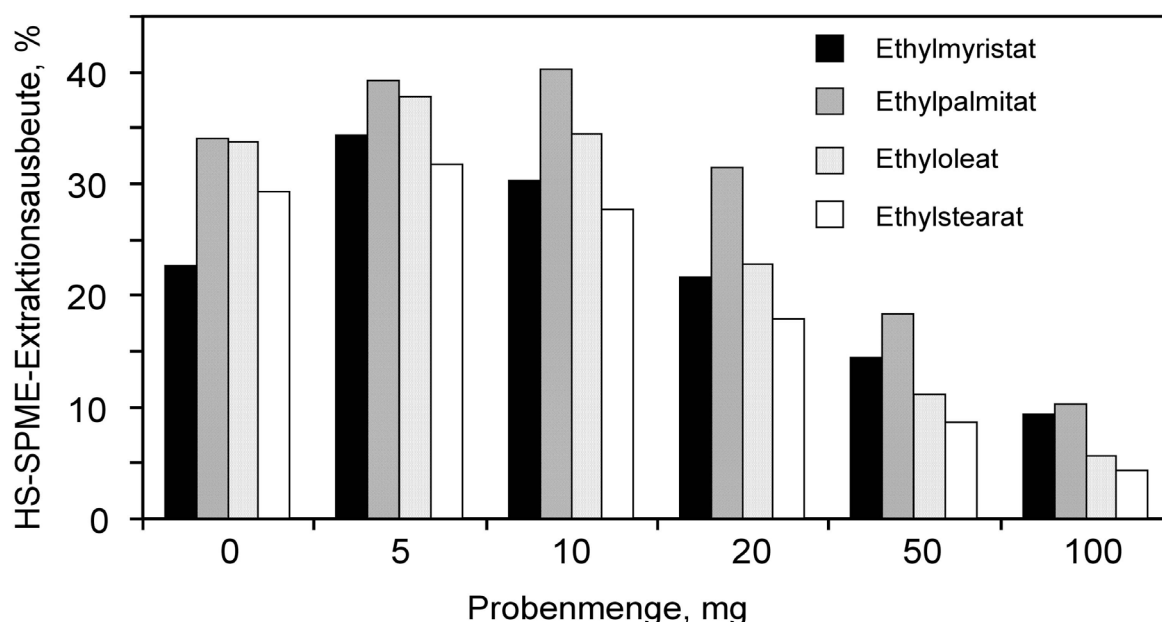


Abb. 17: Absolute Extraktionsausbeuten bei der HS-SPME-Extraktion von FSEE aus Haarextrakten bei Variation der Haareinwaage.

4.1.4 Entwicklung der GC-MS-Methode zur FSEE-Bestimmung

Bei der Methodenentwicklung wurden zunächst nur die vier FSEE Ethylmyristat (C14-Et), Ethylpalmitat (C16-Et), Ethyloleat (C18 Δ^9 -Et) und Ethylstearat (C18-Et) analysiert, da die entsprechenden Fettsäuren nach Literaturangaben den größten Anteil an der Gesamtheit der in Haarlipiden anwesenden Fettsäuren ausmachen [144]. Im Verlauf der Arbeit wurden weitere FSEE, darunter verzweigte und mehrfach ungesättigte, in die Analytik einbezogen, um einen Gesamtüberblick über die im Haar gespeicherten FSEE zu erhalten, gegebenenfalls die Spezifität der Methode durch Auswahl bestimmter Ester zu erhöhen und nach typischen Veränderungen in den Konzentrationsverhältnissen der Ester zu suchen, wie sie prinzipiell bei chronisch exzessivem Alkoholkonsum oder bei externer Kontamination auftreten können.

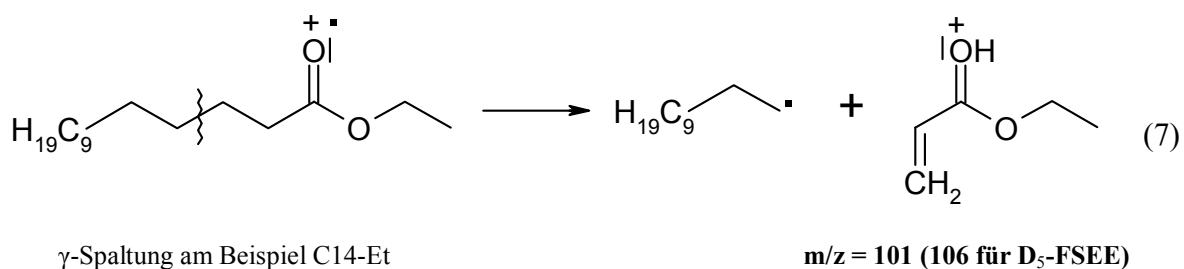
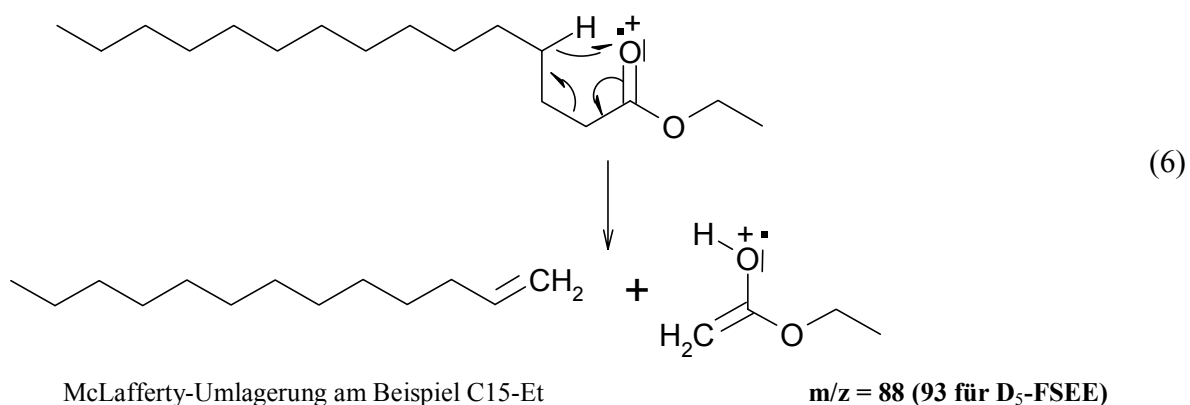
Zum Nachweis der FSEE musste eine leistungsfähige GC-MS-Methode erstellt werden, die es erlaubt, alle zu erfassenden FSEE sowie deren deuterierte D₅-Analoga in einem Analysengang mit ausreichender Empfindlichkeit zu detektieren. Zu diesem Zwecke wurden zunächst die Massenspektren und die Retentionszeiten aller einbezogenen Ethylester bzw. der entsprechenden deuterierten Standards gemessen. Dazu wurde für jeden der zu untersuchenden FSEE je 1 μ l einer Lösung von 100 μ g/ml in Chloroform direkt ins GC-MS injiziert und im Full Scan-Modus unter Verwendung des in Abschnitt 3.4.4.2 beschriebenen Temperaturprogramms gemessen. Die Retentionszeiten unter diesen Bedingungen und die Molmassen der 72 Verbindungen sind in Tabelle 7 angegeben. Typische Beispiele für Massenspektren gesättigter, ungesättigter und verzweigter FSEE sind in den Abb. 18-20 dargestellt. Die Massenspektren aller untersuchten Verbindungen sind im Anhang (Abschnitt 8) zu finden. Die Spektren der deuterierten FSEE sind dort jeweils neben denen der entsprechenden nicht deuterierten dargestellt. FSEE mit gleicher Kohlenstoffanzahl sind seitenweise zusammengefasst. In allen gemessenen Spektren ist das Signal für das Molekülion klar erkennbar.

Ein durchgängig in allen Spektren auftretendes Fragment ist das McLafferty-Ion, das durch eine Umlagerung unter Abspaltung eines Olefins aus dem Molekülion entsteht (vgl. Gl. (6), $m/z = 88$ für nicht deuterierte bzw. 93 für deuterierte FSEE). Bei den gesättigten FSEE bildet dieses Ion den Basispeak. Das Ion der Masse 101 (bzw. 106) – ein Produkt der γ -Spaltung (vgl. Gl. (7)) – ist ebenfalls in allen Spektren gut zu sehen.

Tabelle 7: Retentionszeiten R_t unter den in Abschnitt 3.4.4.2 genannten Bedingungen und Molmassen der in dieser Arbeit untersuchten FSEE.

FSEE*	R_t in min	Molmasse in g/mol	FSEE*	R_t in min	Molmasse in g/mol
D ₅ - iC14-Et	9,21	261,4	C18 $\Delta^{9,12}$ -Et	11,24	308,4
iC14-Et	9,23	256,4	aC18-Et	11,24	312,5
D ₅ - aC14-Et	9,25	256,4	D ₅ - C18 Δ^6 -Et	11,25	315,6
aC14-Et	9,27	261,4	D ₅ - C18 Δ^9 -Et	11,25	315,6
D ₅ - C14 Δ^9 -Et	9,35	259,5	C18 Δ^6 -Et	11,27	310,5
C14 Δ^9 -Et	9,37	254,4	C18 Δ^9 -Et	11,27	310,5
D ₅ - C14-Et	9,41	261,4	D ₅ - C18 $\Delta^{9,12,15}$ -Et	11,31	311,5
C14-Et	9,43	256,4	C18 $\Delta^{9,12,15}$ -Et	11,29	306,4
D ₅ - iC15-Et	9,74	275,5	D ₅ - C18 Δ^5 -Et	11,33	315,6
iC15-Et	9,76	270,4	C18 Δ^5 -Et	11,35	310,5
D ₅ - aC15-Et	9,77	275,5	D ₅ - C18-Et	11,37	317,6
aC15-Et	9,79	270,4	D ₅ - C18 Δ^{13} -Et	11,38	315,6
D ₅ - C15-Et	9,92	275,5	C18-Et	11,39	312,5
C15-Et	9,94	270,4	C18 Δ^{13} -Et	11,40	310,5
D ₅ - iC16-Et	10,25	289,5	D ₅ - iC19-Et	11,64	331,6
iC16-Et	10,27	284,4	iC19-Et	11,67	326,5
D ₅ - aC16-Et	10,28	289,5	D ₅ - C19 Δ^{10} -Et	11,69	329,6
aC16-Et	10,30	284,4	C19 Δ^{10} -Et	11,72	324,5
D ₅ - C16 Δ^9 -Et	10,32	287,5	D ₅ - C19-Et	11,80	331,6
C16 Δ^9 -Et	10,34	282,4	C19-Et	11,82	326,5
D ₅ - C16-Et	10,44	289,5	D ₅ - C20 $\Delta^{8,11,17}$ -Et	12,04	339,6
C16-Et	10,46	284,4	C20 $\Delta^{8,11,17}$ -Et	12,06	334,6
D ₅ - iC17-Et	10,73	303,6	D ₅ - iC20-Et	12,06	345,6
iC17-Et	10,75	298,5	iC20-Et	12,08	340,5
D ₅ - aC17-Et	10,76	303,6	D ₅ - C20 $\Delta^{11,14}$ -Et	12,10	341,6
aC17-Et	10,79	298,5	D ₅ - C20 Δ^5 -Et	12,11	343,6
D ₅ - C17 Δ^{10} -Et	10,80	301,5	D ₅ - C20 Δ^{11} -Et	12,12	343,6
C17 Δ^{10} -Et	10,83	296,4	C20 Δ^{11} -Et	12,13	338,5
D ₅ - C17-Et	10,89	303,5	C20 Δ^5 -Et	12,13	338,5
C17-Et	10,91	298,4	C20 $\Delta^{11,14}$ -Et	12,13	336,5
D ₅ - C18 $\Delta^{6,9,12}$ -Et	11,15	311,5	D ₅ - C20 Δ^{13} -Et	12,15	343,6
C18 $\Delta^{6,9,12}$ -Et	11,18	306,4	D ₅ - C20 $\Delta^{11,14,17}$ -Et	12,16	339,6
D ₅ - iC18-Et	11,20	317,6	C20 Δ^{13} -Et	12,17	338,5
D ₅ - aC18-Et	11,22	317,6	C20 $\Delta^{11,14,17}$ -Et	12,18	334,5
iC18-Et	11,22	312,5	D ₅ - C20-Et	12,21	345,6
D ₅ - C18 $\Delta^{9,12}$ -Et	11,23	313,5	C20-Et	12,23	340,5

* Systematik der Abkürzungen wie in Tabelle 3, deuterierten FSEE ist „D₅ -“ vorangestellt.



Abgesehen von diesen für alle untersuchten FSEE allgemein gültigen Mechanismen zeigen die gesättigten und die ungesättigten FSEE ein unterschiedliches Fragmentierungsverhalten.

Massenspektren gesättigter FSEE

Als Beispiel ist in Abb. 18 das Massenspektrum von Ethylstearat (C18-Et) dargestellt. Bei den gesättigten FSEE führen neben McLafferty-Umlagerung und γ -Spaltung die unter homolytischer Spaltung einer C-C-Bindung analog zur γ -Spaltung gebildeten Ionen zu den stärksten charakteristischen Massenpeaks. Sie entstehen formal durch Abspaltung von $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_k$ -Einheiten von den Molekülionen ($k \leq n-5$, mit n = Anzahl der Kohlenstoffatome der zugrunde liegenden Fettsäure). Die stärksten Peaks dieser Art liefern bei unverzweigten gesättigten FSEE die Ionen $[\text{M}-43]^+$ und die Ionen mit $m/z = 157$ ($m/z = 162$ für D₅-FSEE). Da die Estergruppe noch Bestandteil dieser Fragmente ist, können deuterierter Standard und nicht deuterierter Ester auch anhand dieser Ionenspuren getrennt voneinander ausgewertet werden.

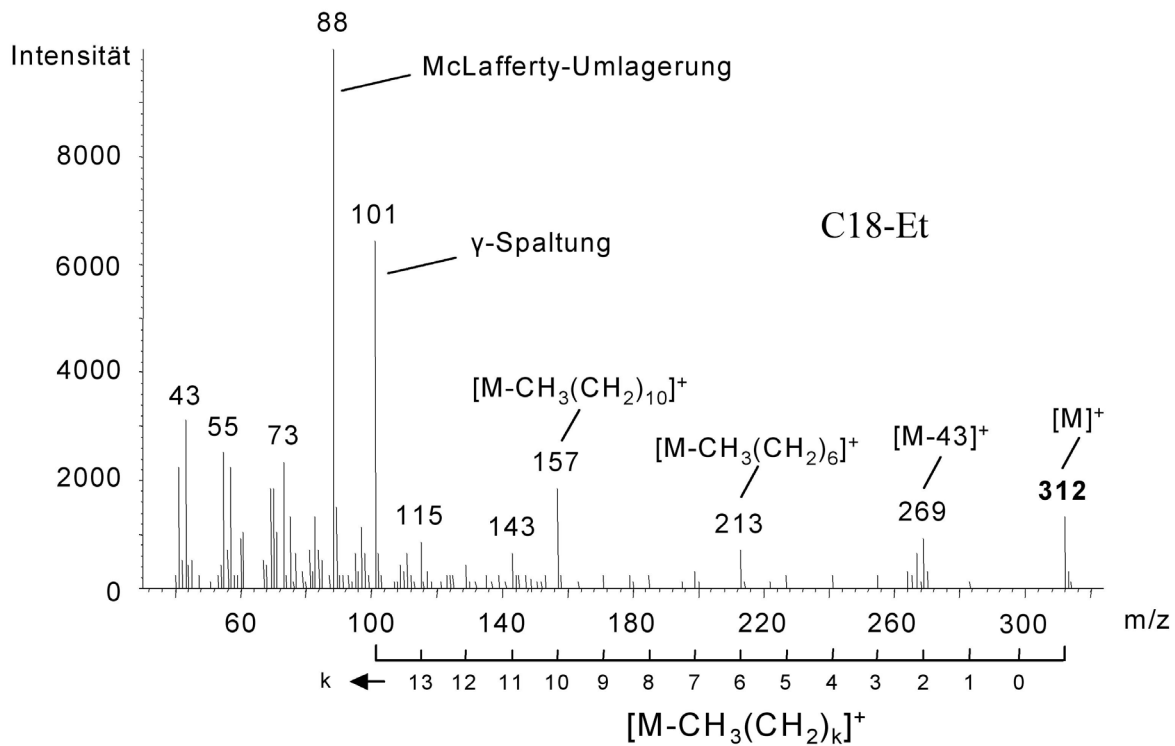


Abb. 18: Massenspektrum von Ethylstearat (C18-Et) mit Zuordnung der Fragmente. Die Skala für $k = 0-13$ markiert die durch Abspaltung der entsprechenden Alkylreste vom Molekulation gebildeten Ionen.

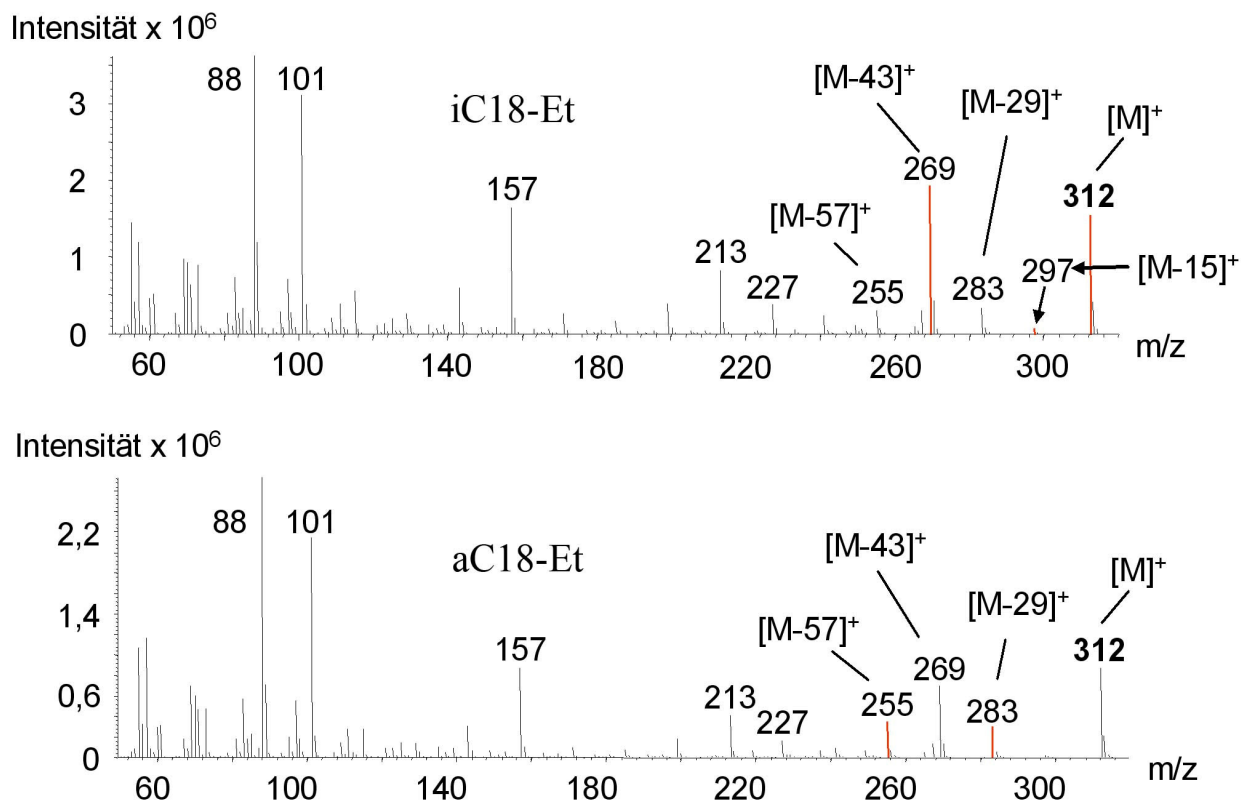
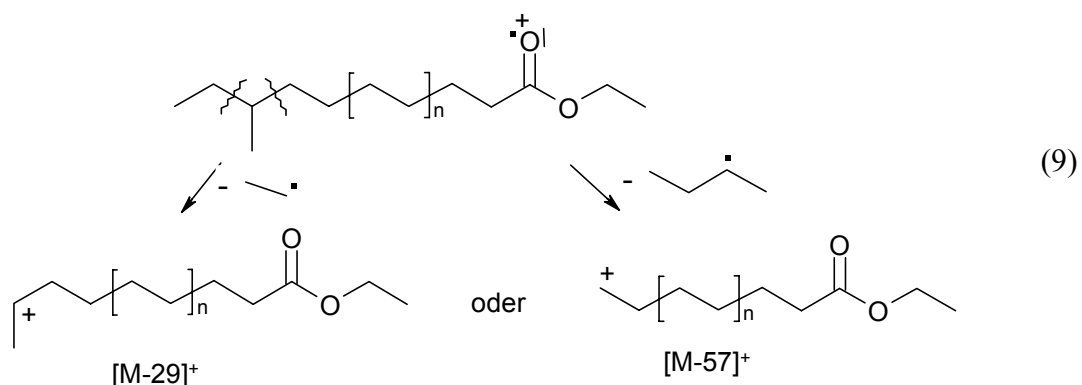
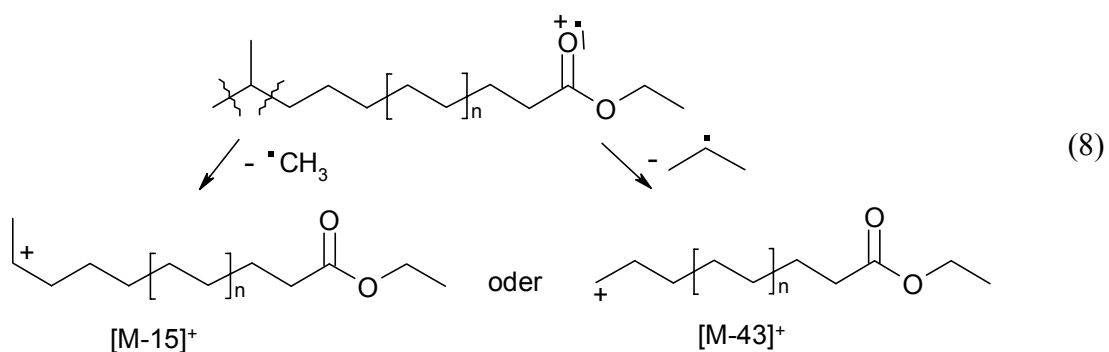


Abb. 19: Massenspektren von 16-Methylheptadecansäure (*i*C18-Et) und 15-Methylheptadecansäure (*a*C18-Et); rot gekennzeichnet sind die Massen mit vergleichsweise höheren Intensitäten.

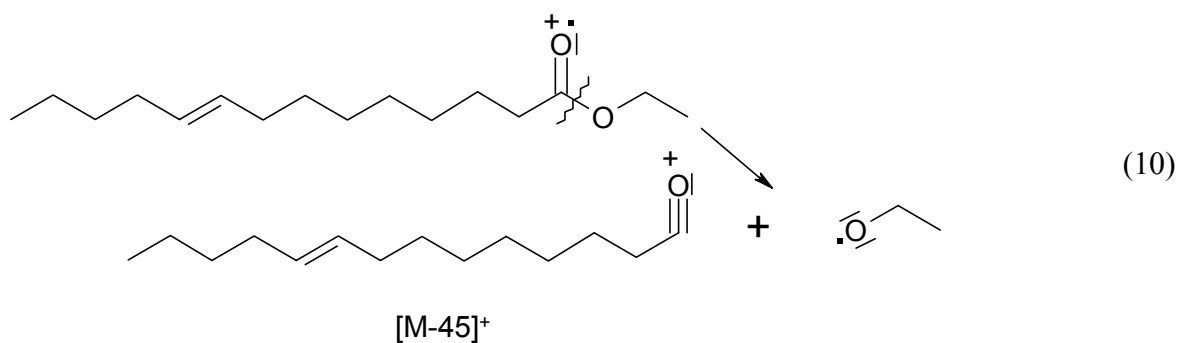


Bevorzugte Spaltprodukte von in Iso- bzw. Anteiso-Position methylverzweigten FSEE

Da die Spaltung der C-C-Bindung in Nachbarschaft zu Methylverzweigungen bevorzugt wird, unterscheiden sich die verschiedenen Isomere der gesättigten FSEE (iso/anteiso/unverzweigt) bezüglich der Intensitäten relativ zum Basispeak der Ionen $[M-15]^+$, $[M-29]^+$, $[M-43]^+$ und $[M-57]^+$ (vgl. Gl. (8) und (9), Abb. 18 und 19 sowie die Massenspektren im Anhang, s. Abschnitt 8 a, b, c, d, e und h). So ist die Intensität des Ions $[M-15]^+$ bei Verzweigungen in Iso-Position größer als die bei Verzweigungen in Anteiso-Position oder bei unverzweigten Estern. Dagegen ist die Intensität von $[M-57]^+$ und geringfügig die von $[M-29]^+$ bei Estern mit einer Verzweigung in Anteiso-Position größer als die der anderen beiden Isomere. Entsprechend ist das Signal für $[M-43]^+$ bei Iso-Verzweigung am größten. Interessant ist, dass auch der Molpeak bei FSEE mit Iso-Verzweigung relativ zum Basispeak größer ist als bei den anderen untersuchten Isomeren.

Massenspektren ungesättigter FSEE

Demgegenüber sind die Massenspektren der ungesättigten FSEE durch die große Fülle von Fragmenten vergleichsweise informationsarm. Als Beispiel ist in Abb. 20 das Massenspektrum des Ölsäureethylesters ($C_{18}\Delta^9$ -Et) dargestellt. Charakteristische Ionen dieser Spektren sind neben dem McLafferty-Ion das entsprechende Gegenstück $[M-88]^+$ und das



Abspaltung des Ethoxy-Radikals am Beispiel $C_{14}\Delta^9$ -Et

Ion $[M-45]^+$, das durch Abspaltung des Ethoxyradikals (vgl. Gl. 10) entsteht ($[M-93]^+$ und $[M-50]^+$ für die deuterierten Analoga). Im Gegensatz zu den gesättigten Estern unterscheiden sich die Spektren der deuterierten und nicht deuterierten ungesättigten FSEE bis auf die Molekülionen und die Ionen $[88]^+$ bzw. $[93]^+$ sowie $[101]^+$ bzw. $[106]^+$ kaum, da bei der Mehrzahl der Ionen, die eine ausreichende Intensität aufweisen, der CH_3-CH_2-O - bzw. der CD_3-CD_2-O -Rest bereits abgespalten ist.

Da sich nach der Ionisierung im Massenspektrometer Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette beliebig umlagern können, sind die Spektren von an unterschiedlicher Position ungesättigten FSEE gleicher Molmasse praktisch nicht zu unterscheiden (vgl. die Massenspektren im Anhang 8 f). Ungesättigte FSEE gleicher Summenformel lassen sich daher

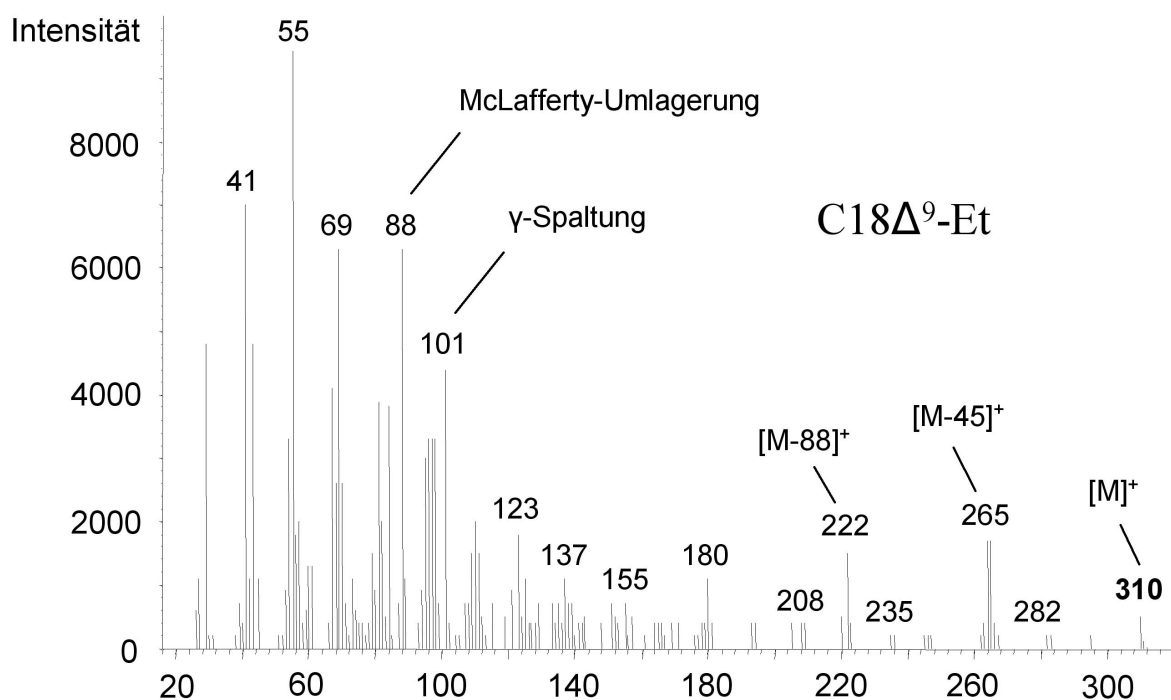


Abb. 20: Massenspektrum von Ölsäureethylester ($C_{18}\Delta^9$ -Et).

bezüglich der Lage der Doppelbindung nur identifizieren, wenn sie gaschromatographisch ausreichend sauber voneinander getrennt werden. Die gemessenen Retentionszeiten für $C18\Delta^5$ -Et, $C18\Delta^6$ -Et, $C18\Delta^9$ -Et und $C18\Delta^{13}$ -Et in Tabelle 7 belegen, dass die verwendete Trennsäule dies grundsätzlich leistet. Lediglich $C18\Delta^6$ -Et und $C18\Delta^9$ -Et liegen von der Retentionszeit her so nahe beisammen, dass eine Trennung nicht möglich ist. Es ist jedoch anzunehmen, dass das Δ^9 -Isomer (Ölsäureethylester) stark überwiegt, da Ölsäure neben Palmitin- und Stearinsäure die dominierende freie Fettsäure im Sebum ist (vgl. Abschnitt 2.2.3). Bei den einfach ungesättigten Ethylestern $C20\Delta^5$ -Et, $C20\Delta^{11}$ -Et und $C20\Delta^{13}$ -Et ergibt sich mit der verwendeten Säule für die beiden erstgenannten Ester ebenfalls kein Retentionszeitunterschied. Dieses Problem wurde bis zur Untersuchung der Haarproben zurückgestellt. Im Verlaufe der Messung und Auswertung der Haarproben konnten keine derartigen Ester nachgewiesen werden. Die Trennung von $C20\Delta^5$ -Et und $C20\Delta^{11}$ -Et war daher nicht erforderlich.

Identifizierung verzweigter FSEE

Für die gesättigten Fettsäureethylester mit Methylverzweigungen in Iso- bzw. Anteiso-Position und die unverzweigten FSEE gleicher C-Anzahl konnten zwar im direkten Vergleich charakteristische Unterschiede in den Intensitätsverhältnissen einzelner Ionen festgestellt werden (vgl. Abb. 19), diese ermöglichen jedoch keine eindeutige Identifizierung. Daher müssen zur separaten Detektion und Ermöglichung einer Quantifizierung auch diese FSEE bereits über die Retentionszeiten voneinander unterscheidbar sein. Die Retentionszeiten der verzweigten sind deutlich kleiner als die der unverzweigten FSEE gleicher Kohlenstoffanzahl ($\Delta t > 0,1$ min) und die Retentionszeiten von iso-verzweigten Estern sind um 0,03 bis 0,04 min kleiner als die von Estern mit Verzweigung in Anteiso-Position.

Chromatographische Trennung aller untersuchten FSEE

Die zu untersuchenden FSEE sollten sich somit abgesehen von den angegebenen, für die Praxis irrelevanten Ausnahmen gut trennen und auswerten lassen. Ein Totalionen-chromatogramm einer Testlösung mit 32 Ethylestern konnte diese Annahme bestätigen (Abb. 21). Durch Betrachtung geeigneter charakteristischer Molekülfragmente können auch die im GC nicht ausreichend getrennten FSEE klar unterschieden werden. Für FSEE

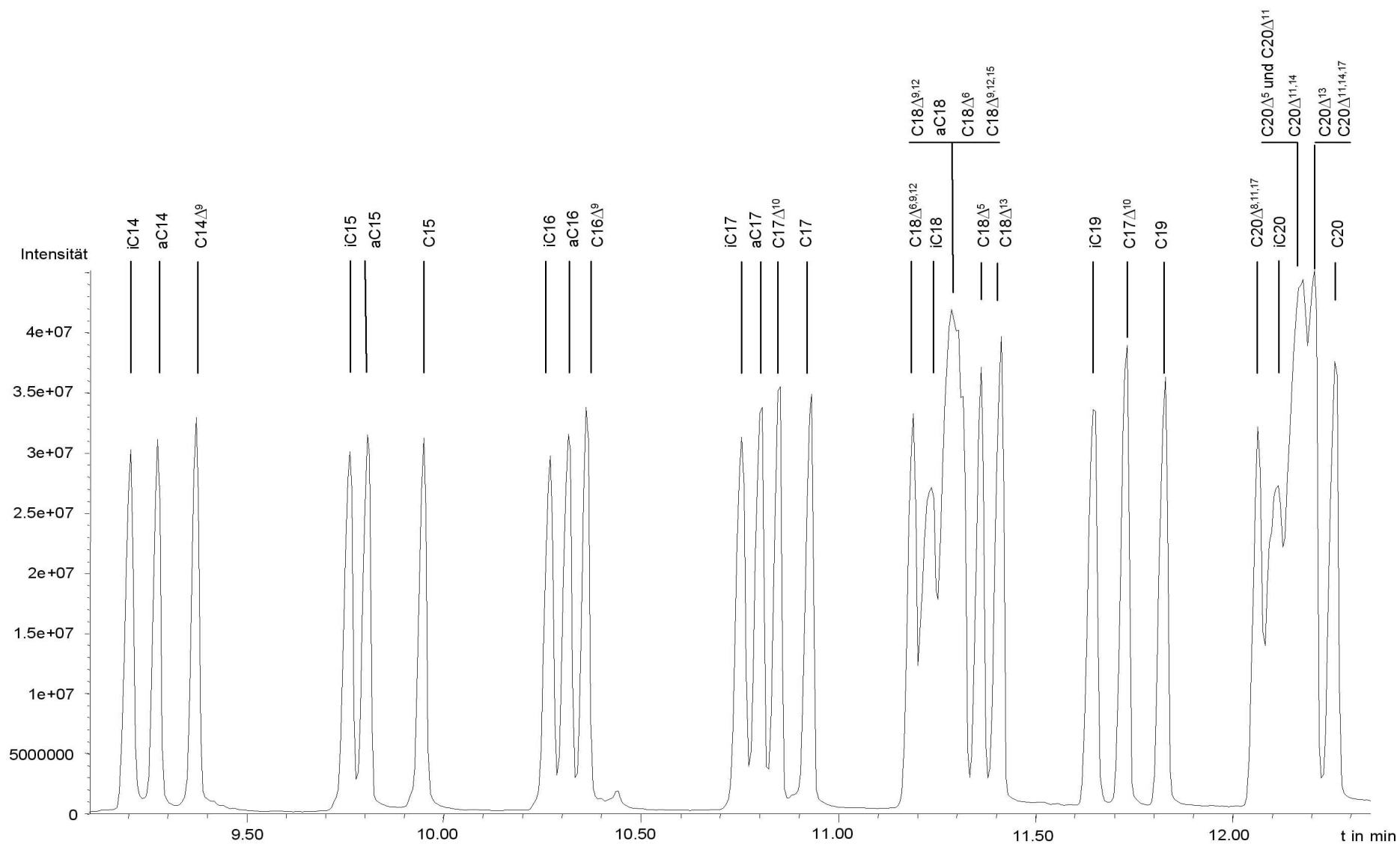


Abb. 21: Totalionenchromatogramm bei Analyse einer Mischung aus Standardlösungen von 32 Fettsäureethylestern (C14-Et, C16-Et, C18 Δ^9 -Et und C18-Et wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgenommen). Injektionsvolumen 1 μ l, Konzentration je 31,25 μ g/ml.

mit 18+2 C-Atomen ist dies in Abb. 22 exemplarisch dargestellt – der Übersichtlichkeit halber sind nur die Massenspuren der Molekülonen $[M]^+$ abgebildet. Durch Wechselwirkungen der Ester untereinander sind hier die Retentionszeiten im Vergleich zu den Einzelmessungen teilweise um bis zu 2 s verschoben (vgl. Werte für R_t in Tabelle 7). Die Identifizierung der FSEE wurde dadurch nicht beeinträchtigt, da die deuterierten Standards eine ähnliche Verschiebung zeigten und die Retentionszeitdifferenzen zwischen FSEE und D_5 -FSEE nicht mehr als 0,5 s von den bei den Einzelmessungen festgestellten Differenzen

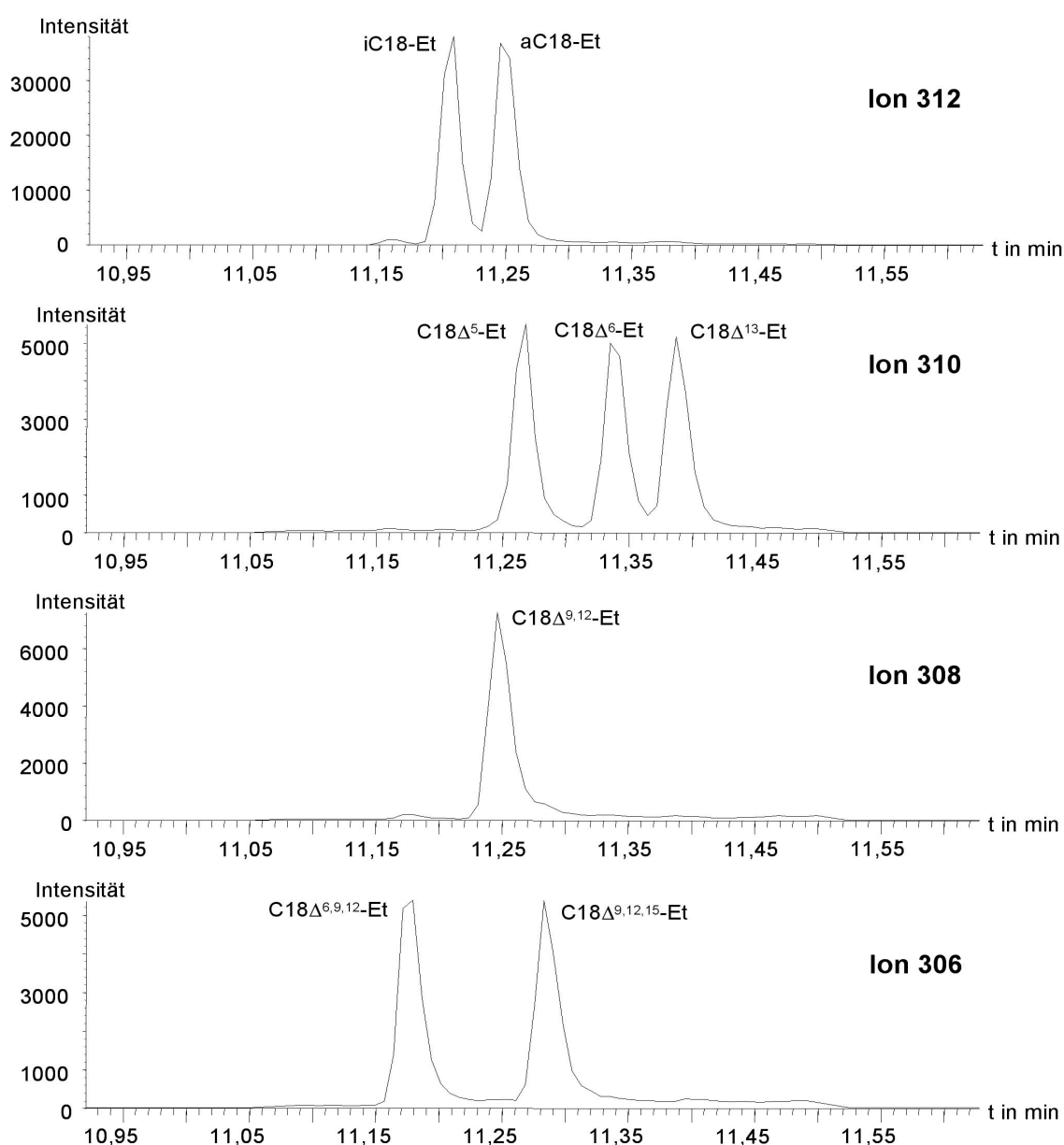


Abb. 22: Charakteristische Massenspuren der im Totalionenchromatogramm (TIC) nicht sauber getrennten FSEE mit 18 + 2 C-Atomen (die Ionenspuren wurden aus dem Datenfile, das in Abb. 21 als TIC dargestellt ist, extrahiert).

abwichen. Auf Grundlage der in den Einzelmessungen und der Testlösung (Abb. 21) ermittelten Retentionszeiten wurden für die einzelnen FSEE SIM-Fenster definiert. Da sich die Retentionszeiten von FSEE gleicher C-Anzahl nur geringfügig unterschieden, wurden alle FSEE mit gleicher Kohlenstoffanzahl jeweils in einem SIM-Fenster zusammengefasst. Für einige FSEE wurde nur die Molmassenspur aufgenommen und auf das Mitführen von Bestätigungsmassen bewusst verzichtet, da bis zu 8 FSEE in einem Zeitfenster zu messen waren und die Nachweisempfindlichkeit sonst zu stark herabgesetzt worden wäre. Bei Fettsäureethylestern, die nach den ersten Haaruntersuchungen als mögliche Alkoholmarker infrage kamen, wurde mindestens eine weitere substanzcharakteristische Bestätigungsmasse mit möglichst hoher Intensität hinzugefügt.

Die Identifizierung der FSEE erfolgte somit durch Prüfung auf den Molpeak und mindestens eine weitere charakteristische Masse zur richtigen Retentionszeit (in Abb. 23: $m/z = 298$ und 157) und durch die Prüfung der Retentionszeitdifferenz zwischen FSEE und entsprechendem deuteriertem Standard (in Abb. 23: $m/z = 303$ und 162), der je nach FSEE zwischen 0,01 und 0,03 min bei kürzerer Retentionszeit der D_5 -FSEE liegen muss.

13 Alkoholikerhaarproben wurden mit der oben beschriebenen Methode auf alle genannten Ester überprüft. Das in sieben Zeitfenstern (vgl. Tabelle 4) mit unterschiedlichen SIM-Massen aufgenommene Chromatogramm ist für eine solche Probe in Abb. 24 wiedergegeben. Der Übersichtlichkeit halber sind nur die Molekülionen-Massen der nicht deuterierten Verbindungen in die Darstellung einbezogen. Bei den Estern der C_{18} -Carbonsäuren

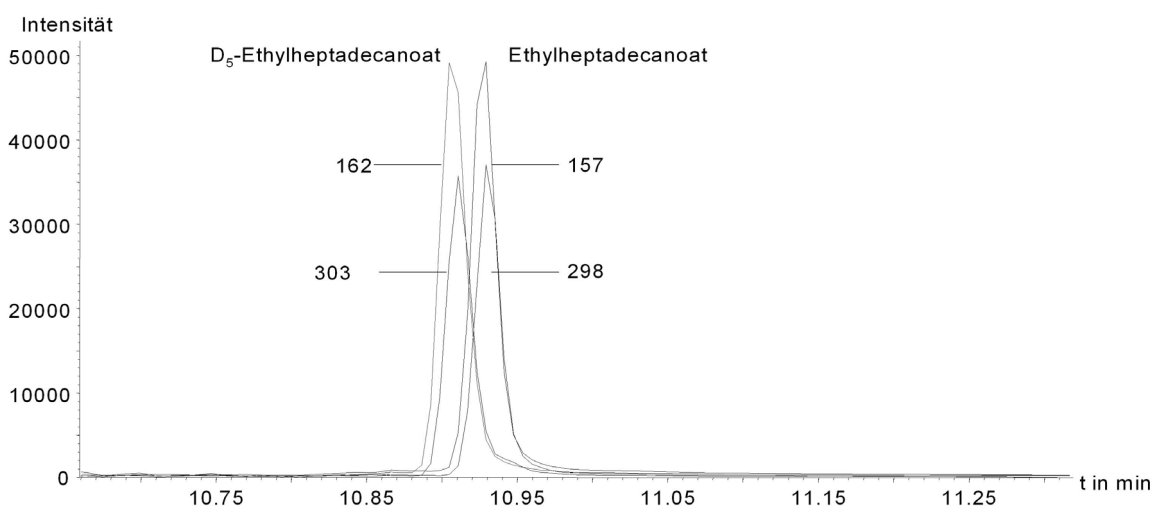


Abb. 23: GC-MS-SIM-Chromatogramm für C_{17} -Et (Ethylheptadecanoat, $R_t = 9,95$ min) und D_5 - C_{17} -Et (D_5 -Ethylheptadecanoat, $R_t = 9,93$ min). Es sind jeweils die Massenspuren für das Molekülion ($m/z = 298$ u. 303) und die Bestätigungsmassen ($m/z = 157$ u. 162) dargestellt.

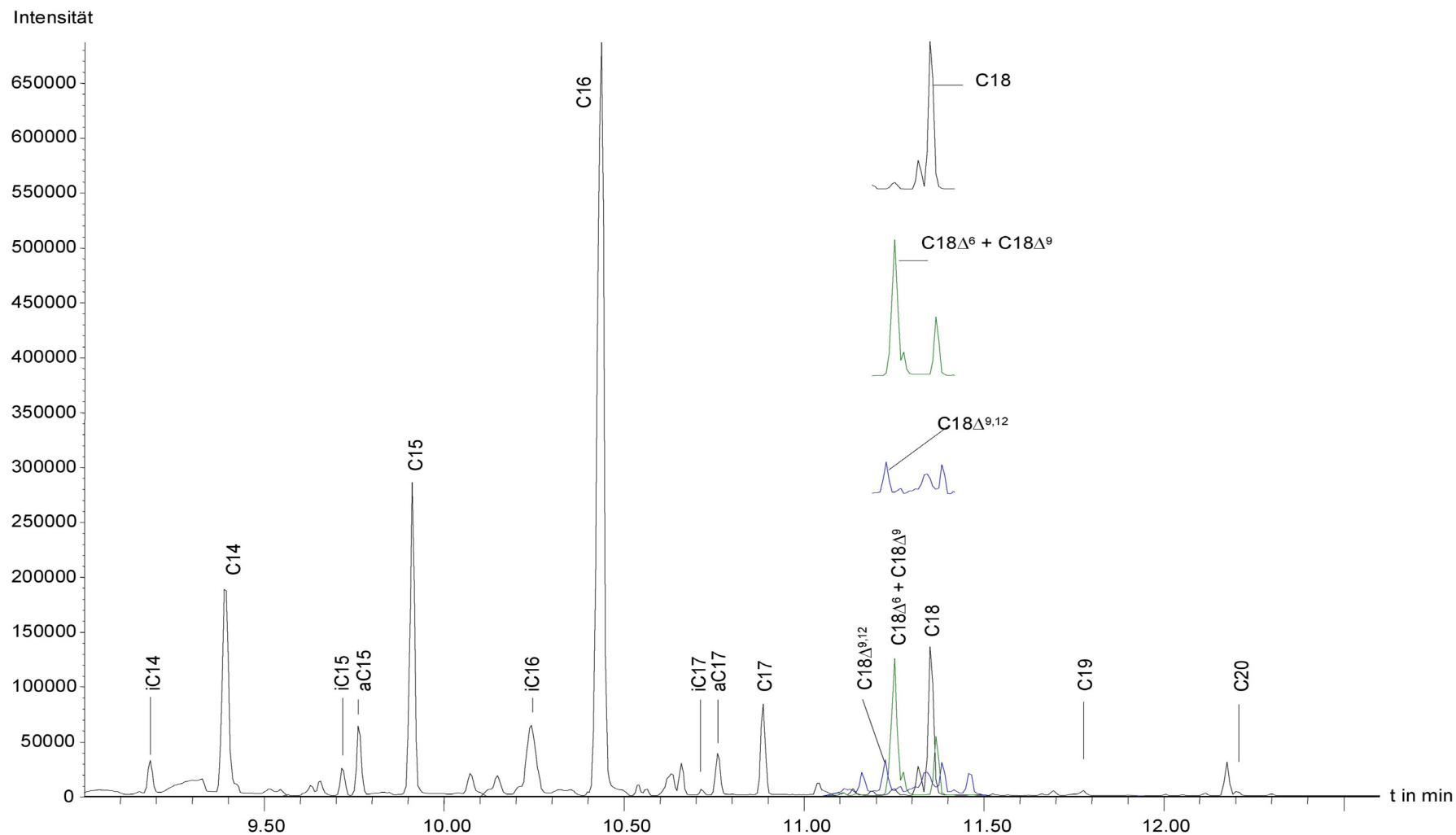


Abb. 24: SIM-Chromatogramm der Haarprobe SN 529/01 (50 Jahre alt gewordener, männlicher Alkoholiker, postmortale BAK 3,2 mg/g). Es wurden die Ethylester folgender Carbonsäuren identifiziert: iC14 = 12-Methyltridecansäure 0,73 ng/mg, C14 = Myristinsäure 2,58 ng/mg, iC15 = 13-Methylmyristinsäure 0,14 ng/mg, aC15 = 12-Methylmyristinsäure 0,63 ng/mg, C15 = Pentadecansäure 1,32 ng/mg, iC16 = 14-Methylpentadecansäure 0,60 ng/mg, C16 = Palmitinsäure 3,82 ng/mg, iC17 = 15-Methylpalmitinsäure 0,02 ng/mg, aC17 = 14-Methylpalmitinsäure 0,20 ng/mg, C17 = Heptadecansäure 0,41 ng/mg, C18 $\Delta^{9,12}$ = Linolsäure 0,79 ng/mg, C18 Δ^6 = cis-6-Octadecensäure + C18 Δ^9 = Ölsäure 7,85 ng/mg, C18 = Stearinsäure 1,55 ng/mg, C19 = Nonadecansäure positiv, C20 = Arachinsäure 0,12 ng/mg.

wurden unter Einbeziehung der einfach und doppelt ungesättigten Verbindungen drei Ionenspuren aufgezeichnet ($m/z = 312, 310$ und 308), die in diesem Zeitfenster oberhalb nochmals separat abgebildet sind. Man erkennt, dass die Ester gleicher Molasse sehr gut voneinander getrennt sind. Lediglich die beiden isomeren, einfach ungesättigten C18-Ester führen wie erwartet zu einem gemeinsamen Signal.

Bei der quantitativen Auswertung der 13 Alkoholikerhaarproben wurden für die vier Ester Ethylmyristat (C14-Et), Ethylpalmitat (C16-Et), Ethyloleat (C18 Δ^9 -Et) und Ethylstearat (C18-Et) die höchsten Haarkonzentrationen ermittelt, während die Ester C15-Et, aC15-Et, C17-Et und aC17-Et durchweg etwas geringere Konzentrationen aufwiesen und die Ester mit Verzweigung in Iso-Position sowie der doppelt ungesättigte Ester C18 $\Delta^{9,12}$, C19-Et und C20-Et meist nur im Bereich der Nachweisgrenze gefunden wurden. Für die n-Heptan-Waschflüssigkeiten, die ebenfalls untersucht wurden, ergaben sich ähnliche Konzentrationsverteilungen. Die weiteren Untersuchungen wurden daher auf die vier genannten in der höchsten Konzentration vorkommenden Ester beschränkt, um einerseits den Aufwand bei der Datenauswertung im Rahmen zu halten, andererseits aber die Möglichkeit zu erhalten, Aussagen bezüglich der Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Ester zueinander machen zu können (vgl. Tabelle 14).

4.1.5 Entwicklung des analytischen Verfahrens zur Squalenbestimmung

Die Strukturformel des Squalens ist in Abb. 25 dargestellt. In bisherigen Untersuchungen, die in erster Linie aus Sebum vorgenommen wurden, kamen verschiedene analytische Methoden zur Bestimmung des Squalengehalts zum Einsatz. Neben der Dünnschichtchromatographie [196-200] wurde Gaschromatographie [201] und GC-MS [202,203], aber auch HPLC mit UV-Detektion [201,204] eingesetzt. Systematische Untersuchungen von Squalen im Haar wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Zunächst wurde die Bestimmung mittels HS-SPME/GC-MS in einem Analysengang mit

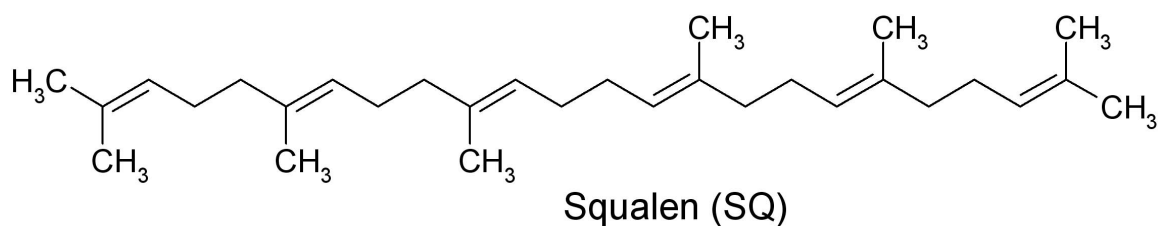


Abb. 25: Strukturformel des Squalens.

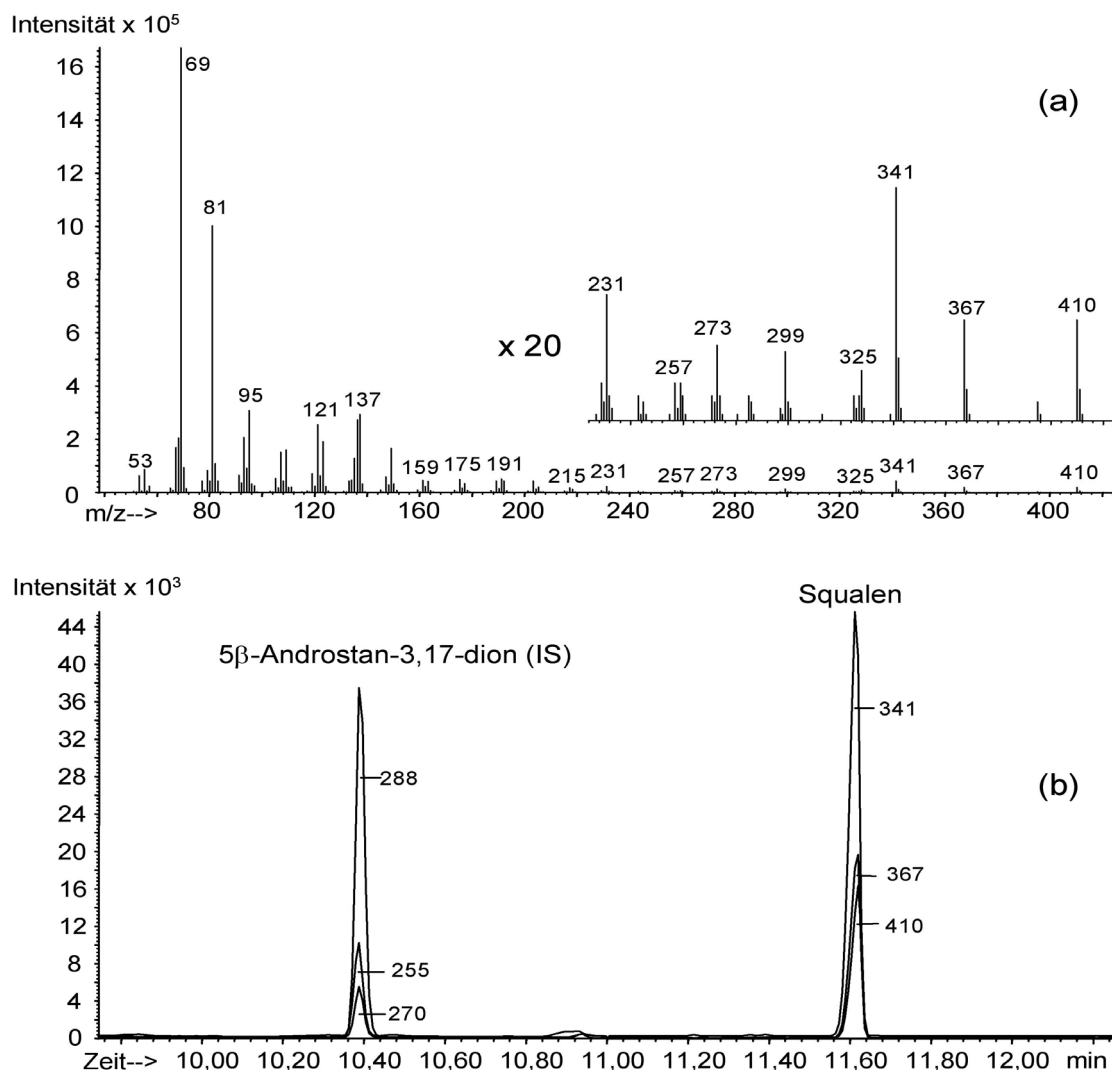


Abb. 26: Massenspektrum des Squalens (a) und ein typisches bei Analyse eines Haarextraktes erhaltenes Chromatogramm unter Verwendung von 5 β -Androstan-3,17-dion als innerem Standard (b). Die Squalenkonzentration im Haar betrug 0,53 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

den FSEE angestrebt. Da die Squalenkonzentration c_{SQ} im Haar um Größenordnungen über der $c_{\text{i-FSEE}}$ liegt, war dies wegen Sättigungseffekten, die an der Faser auftraten und eine verlässliche Quantifizierung unmöglich machten, nicht durchführbar. Als zweite Möglichkeit wurde ein Aliquot des Haarextraktes mit innerem Standard versetzt, direkt in das GC-MS eingespritzt und im SIM-Modus gemessen. Zunächst durchgeführte Versuche mit Squalan, dem Dodecahydroprodukt des Squalens als innerem Standard ergaben keine zufrieden stellende Reproduzierbarkeit. Bei Verwendung von 5 β -Androstan-3,17-dion, das für die GC-MS-Analyse schließlich als innerer Standard gewählt wurde, trat dieses Problem dagegen nicht auf. Zur Kalibration wurden Mengen zwischen 100 ng und 3,5 μg Squalen und 100 ng innerer Standard in 30 μl Ethylacetat gelöst und 1 μl in das GC-MS eingespritzt. Es ergab sich eine lineare Kalibrationsfunktion ($R^2 = 0,9992$) mit y-Achsen-

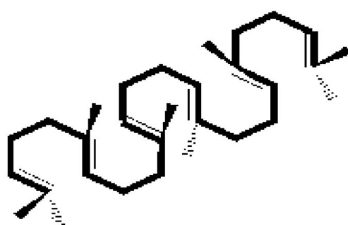


Abb. 27: Mögliche Konformation des Squalenmoleküls.

abschnitt 0. In Abb. 26 sind das Massenspektrum des Squalens und ein typisches Chromatogramm eines Haarextraktes abgebildet.

Schließlich wurde eine HPLC-DAD-Methode zur Bestimmung des Squalens entwickelt. Obwohl man bei den vorliegenden isolierten C-C-Doppelbindungen die langwelligste Absorptionsbande im Bereich um 185 nm erwarten würde, zeigt Squalen eine ausgeprägte UV-Absorption zwischen 190 und 220 nm. Diese bathochrome Verschiebung beruht vermutlich auf der Wechselwirkung von π -Elektronen benachbarter Doppelbindungen bei Faltung des Moleküls in eine Konformation, wie sie in Abb. 27 dargestellt ist und der dadurch bedingten Erniedrigung der Energiedifferenz zwischen π - und π^* -Orbital. Die Chromatogramme für eine nur Squalen enthaltende Testlösung und einen Haarextrakt sind in Abb. 28 zusammen mit dem UV-Spektrum des Squalens abgebildet. Aufgrund der hohen Lipophilie des Squalens wird auf der RP8-Säule eine relativ lange Retentionszeit erreicht, die zu einer effektiven Abtrennung anderer UV-absorbierender im Extrakt enthaltener Substanzen führte. Die GC-MS-Methode und die HPLC-DAD-Methode lieferten bei Untersuchung gleicher Extrakte gut übereinstimmende Ergebnisse. Die HPLC-Methode zeichnete sich durch eine einfache Probenvorbereitung, eine kurze Analysendauer (15 min pro Analyse) und durch eine gute Robustheit aus, die bei der GC-MS-Methode nicht gegeben war und eine tägliche Kalibration notwendig machte. Daher wurde für die weiteren Untersuchungen die HPLC-DAD-Methode gewählt. Um sicherzustellen, dass unter den Extraktionsbedingungen, die für die FSEE-Bestimmung optimiert wurden (vgl. Abschnitt 4.1.2), auch das Squalen vollständig extrahiert wird, wurden jeweils 30 mg einer Alkoholikerhaarprobe wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mit dem zweiphasigen Extraktionsmittel geschüttelt, wobei die Schütteldauer zwischen 2 und 34 Stunden variiert und sowohl auf FSEE als auch auf Squalen untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 dargestellt. Bei der untersuchten Probe stiegen die extrahierten Mengen innerhalb von ca. 10 h bis zu einem nahezu konstanten Wert an. Die Schwankungen der Werte bei

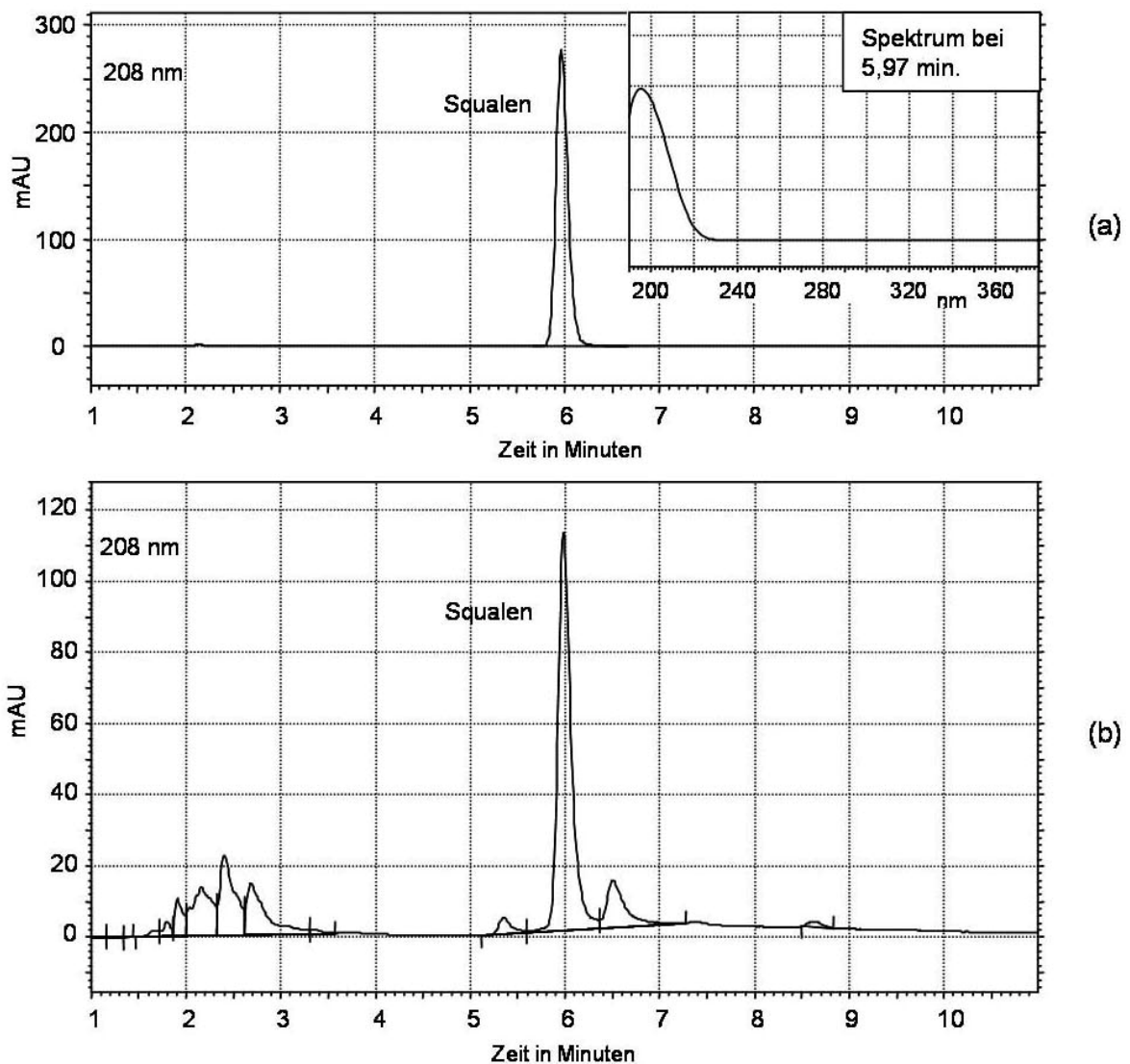


Abb. 28: HPLC-DAD-Chromatogramme von Squalen. (a) Injektion einer Squalen-Lösung in Acetonitril (Injektionsvolumen 10 μ l, Konzentration 0,1 ng/ml), rechts oben ist das UV-Spektrum des Squalens eingefügt. (b) Haarextrakt, Squalenkonzentration im Haar 0,27 ng/mg.

Extraktionszeiten > 10 h können durch Inhomogenität der untersuchten Probe in Verbindung mit der methodisch bedingten Messungenauigkeit (sowohl für c_{i-FSEE} als auch für c_{SQ} zwischen 5 und 10 % Varianz, vgl. Abschnitt 4.1.6) erklärt werden. Es wird deutlich, dass die FSEE und das Squalen mit annähernd gleicher Geschwindigkeit extrahiert werden, wodurch auch bei einer unvollständigen Extraktion der Quotient c_{i-FSEE}/c_{SQ} nahezu konstant bleibt. Die Untersuchung von drei weiteren Proben bestätigte dieses Ergebnis, wobei die Extraktionsgeschwindigkeit sich von Haarprobe zu Haarprobe geringfügig unterschied. In allen vier Fällen war nach ca. 15 h (also der in der Methode festgelegten Extraktionsdauer) kein weiterer Anstieg der extrahierten Mengen mehr feststellbar.

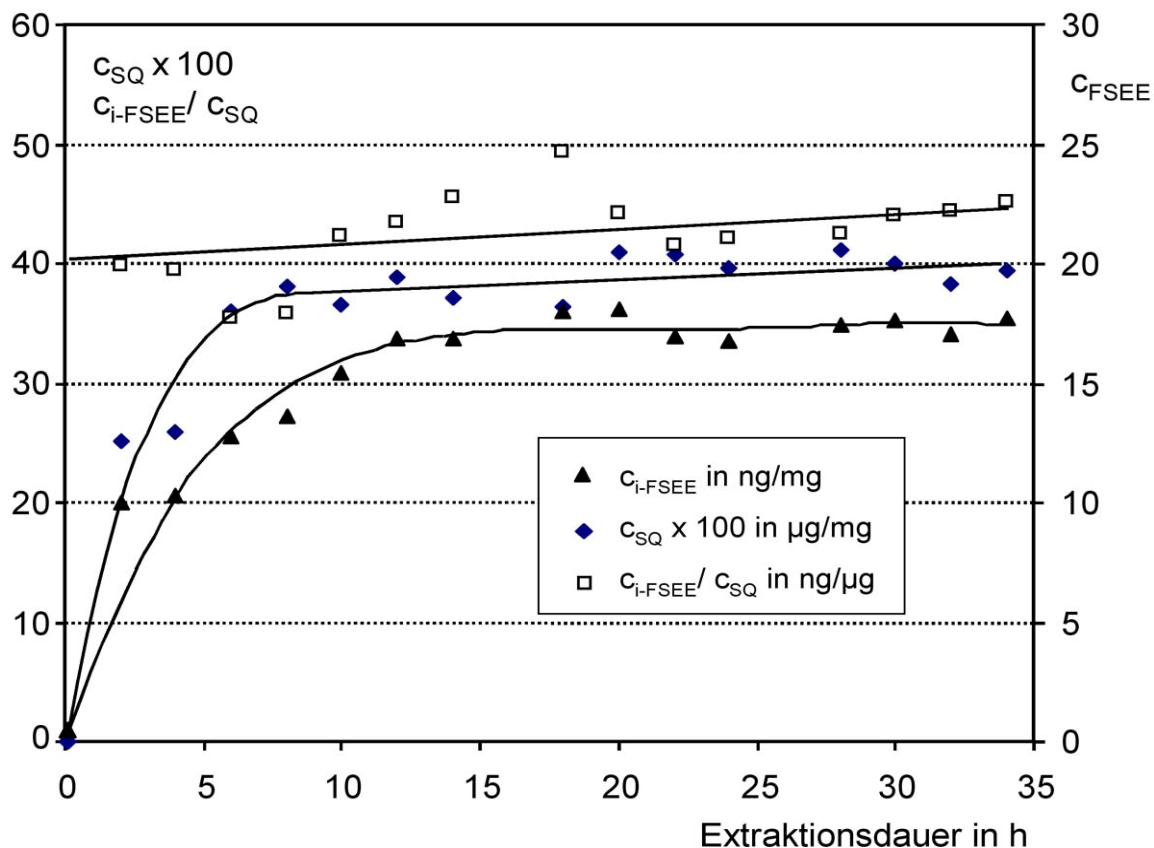


Abb. 29: FSEE-Summenkonzentrationen (c_{i-FSEE}), Squalenkonzentrationen (c_{SQ}) und relative FSEE-Konzentrationen c_{i-FSEE}/c_{SQ} gemessen in der Haarprobe eines Alkoholikers unter Variation der Extraktionsdauer.

4.1.6 Kalibration und Validierung der Methoden

4.1.6.1 Bestimmung der FSEE-Konzentrationen mittels HS-SPME/GC-MS

Die exakte Kalibration und Validierung der Methode wurde auf die vier Ester Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat beschränkt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden im Zusammenhang mit der Kalibration unter Verwendung der Software *Valistat* ermittelt. Dieses Excel-basierte Programm liefert eine mit der DIN-Norm 32645 konforme Auswertung der Validierungsdaten.

Für die Kalibration wurden 10-mal 30 mg eines Abstinenzlerhaarpoools jeweils in ein 4 ml fassendes Glasgefäß mit Schraubgewinde eingewogen. Nach Zugabe von 0,5 ml DMSO und 2 ml n-Heptan wurden 8 Proben auf die in Tabelle 8 angegebenen Konzentrationen aufgestockt, indem jeweils 10 μl einer die vier Ester in geeigneter Konzentration enthaltenden Lösung (in CHCl_3) zugegeben wurden. Die Verteilung von 1 : 4 : 4 : 1 für C14-Et : C16-Et : C18-Et : C18 Δ^9 -Et wurde entsprechend der nach Voruntersuchungen zu erwartenden Verteilung der Ester in den Haarextrakten gewählt. Die ersten 5 Kalibratoren (K1 bis K5), die auch zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen herangezogen

wurden, lagen äquidistant auf den für die Summenkonzentration relevanten Konzentrationsintervall zwischen 0 und 2 ng/mg verteilt, drei weitere Kalibratoren (L1 bis L3) wurden hinzugefügt, um die Kalibrierfunktion auch für sehr hohe Konzentrationssummen bis 16 ng/mg auf Linearität zu prüfen. Danach wurden 10 µl D₅-Fettsäureethylester-Standardmischung (je 2 µg/ml) zugegeben und nach dem in Abschnitt 3.4 beschriebenen Verfahren die FSEE-Konzentrationen bestimmt. Zu den Leerwertproben wurden jeweils 10 µl reines CHCl₃ gegeben, um gleiche Volumen- und Lösungsmittelverhältnisse herzustellen. Insgesamt wurden sechs Kalibrationen an sechs verschiedenen Tagen durchgeführt. Die ermittelten geringen FSEE-Konzentrationen des Abstinenzlerhaarpools (Mittelwerte: C14-Et 0,03 ng/mg, C16-Et 0,05 ng/mg, C18Δ⁹-Et 0,28 ng/mg und C18-Et 0,01ng/mg) wurden jeweils von den direkt aus den Flächenverhältnissen errechneten Konzentrationen der Kalibratoren abgezogen. Es wurde das Flächenverhältnis der Molekülonenpeaks FSEE/D₅-FSEE als Funktion der Konzentration bewertet. Die statistische Auswertung der Daten mit *Valistat* ergab Linearität (Mandel F-Test auf Linearität) über den gesamten Kalibrationsbereich zwischen 0 und 16 ng/mg bei Nachweisgrenzen zwischen 0,006 und 0,035 ng/mg und Bestimmungsgrenzen zwischen 0,020 und 0,112 ng/mg für die vier FSEE. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die relativ hohe Nachweisgrenze für C18Δ⁹-Et ist auf die geringere Signalintensität des Molekülonenpeaks infolge stärkerer Fragmentierung zurückzuführen. Der Grubbs-Test auf Ausreißer fiel für alle FSEE negativ aus. Der F-Test ergab für alle vier Ester homogene Varianzen. Die Steigungen der linearen Kalibrierfunktionen lagen zwischen 0,91 und 0,96, wobei ein Anstieg mit länger

Tabelle 8: Resultierende FSEE-Konzentrationen der aufgestockten Haarproben bei Zugabe von jeweils 10 µl Kalibratorlösung zu 30 mg Haarpool unter Abzug der Leerwerte.

Kalibrator	Ethylmyristat [ng/mg]	Ethylpalmitat [ng/mg]	Ethyloleat [ng/mg]	Ethylstearat [ng/mg]	c _{FSEE} [ng/mg]
K1	0,04	0,16	0,16	0,04	0,4
K2	0,08	0,32	0,32	0,08	0,8
K3	0,12	0,48	0,48	0,12	1,2
K4	0,16	0,64	0,64	0,16	1,6
K5	0,20	0,80	0,80	0,20	2,0
L1	0,40	1,60	1,60	0,40	4,0
L2	0,80	3,20	3,20	0,80	8,0
L3	1,60	6,40	6,40	1,60	16,0

Tabelle 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der HS-SPME/GC-MS-Methode zur Bestimmung von FSEE im Haar nach DIN 32645 sowie Steigung der Kalibrationsgeraden und lineare Regressionskoeffizienten, die aus den Kalibrationsdaten mit Hilfe des Programms *Valistat* berechnet wurden. LOD: Nachweisgrenze (limit of detection), LOQ: Bestimmungsgrenze (limit of quantification), R^2 : linearer Regressionskoeffizient, a: Geradensteigung der Kalibrationsgeraden.

	C14-Et	C16-Et	C18 Δ^9 -Et	C18-Et
LOD	0,011	0,006	0,035	0,014
LOQ	0,035	0,020	0,112	0,042
R^2	0,998	0,999	0,999	0,997
a	0,908	0,917	0,922	0,961

werdender Kohlenstoffkette zu verzeichnen war. Bei Direkteinspritzung der Kalibratoren nach Zusatz von deuterierten inneren Standards wurde hingegen eine Steigung von 1,0 erhalten. Dies deutet darauf hin, dass bei der SPME die deuterierten FSEE eine etwas höhere Affinität zur unpolaren SPME-Faser besitzen als die nicht deuterierten. Dieser Effekt ist bei den kurzkettigeren FSEE aufgrund des höheren relativen Deuterierungsgrades stärker ausgeprägt.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde überprüft, indem ein gut durchmischter Alkoholikerhaarpool 10-mal innerhalb von 2 Tagen gemessen wurde. Dabei ergaben sich relative Standardabweichungen von 15,7 % (Mittelwert 0,09 ng/mg) für Ethylmyristat, 6,6 % (Mittelwert 0,54 ng/mg) für Ethylpalmitat, 5,9 % (Mittelwert 0,58 ng/mg) für Ethyloleat und 3,5 % (Mittelwert 0,15 ng/mg) für Ethylstearat. Die relativ hohe Standardabweichung für Ethylmyristat resultiert aus der niedrigen Konzentration und störenden Matrixbestandteilen im Retentionsbereich dieser Substanz, wirkt sich aber aufgrund des relativ geringen Gesamtanteils von C14-Et an der Konzentrationssumme von ca. 5-10 % nur schwach auf das Ergebnis aus.

4.1.6.2 Bestimmung des Squalengehalts mittels HPLC-DAD

Auf eine Validierung mit *Valistat* wurde hier verzichtet, da ein „Leer-Sebum“ nicht erhältlich ist (natürliches Sebum enthält immer einen Anteil von ca. 10 % Squalen) und eine vollständige Validierung aufgrund der über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachteten guten Flächenkonstanz nicht als notwendig erachtet wurde. Für die Kalibration wurden zehn verschiedene Kalibratoren (zwischen 0,01 und 4 μ g Squalen in 10 μ l Acetonitril) hergestellt und in die HPLC injiziert. Es ergab sich ein linearer Zusammen-

hang zwischen der Squalenkonzentration und der Peakfläche bei 208 nm ($R^2 = 0,9999$). Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze wurden aus dem drei- bzw. zehnfachen Rauschen der Grundlinie im Retentionsbereich des Squalens abgeschätzt und lagen mit 0,003 bzw. 0,01 µg/mg Haar weit unter den zu erwartenden Konzentrationen (die Squalenkonzentrationen von 52 untersuchten Haarproben von Abstinenzlern und Normaltrinkern lagen zwischen 0,10 und 1,97 µg/mg, der Median betrug 0,56 µg/mg). Zur Methodenkontrolle wurden bei jeder Serie mindestens drei Mal 10 µl einer Squalen-Lösung (100 µg/ml in Acetonitril) injiziert. Die statistische Auswertung der auf diese Weise erhaltenen Peakflächen bewies die gute Reproduzierbarkeit der Methode (Standardabweichung von 1,2 %, $n = 57$) auch ohne Zusatz eines inneren Standards. Um die Reproduzierbarkeit der Methode unter Einbeziehung der Haarextraktion zu überprüfen, wurden 35 Haarproben wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben in Dreifachbestimmung bei separater Extraktion untersucht. Die durchschnittliche Standardabweichung für die drei Werte lag mit 6,38 % in einem akzeptablen Bereich. Die relativ zur Messung der reinen Squalen-Lösungen erhöhte Standardabweichung kann durch die inhomogene Verteilung des Analyten in der Gesamthaarprobe erklärt werden.

Bei der Anwendung von Pflastern oder Wischtests zur Sebumgewinnung werden ähnliche Lipidmengen annähernd gleicher Zusammensetzung erhalten wie bei der Haarextraktion, daher besitzen die Betrachtungen bezüglich der Kalibration und der Reproduzierbarkeit der Methode auch bei der Analytik für diese Formen der Probennahme Gültigkeit.

4.2 Untersuchungen zum Einlagerungsmechanismus der FSEE ins Haar

In Abschnitt 2.2.4 wurde bereits auf die prinzipiell möglichen Wege der Substanz-einlagerung in das Haar eingegangen. Als Ort für die Speicherung extrem lipophiler Substanzen wie der FSEE kommt nur der Lipidanteil der Haare infrage. Lipide kommen im bzw. am Haar als äußere Sebumschicht und in Form von Strukturlipiden vor [144,145]. Die Strukturlipide bestehen in erster Linie aus dem an Lipiden reichen Zellmembrankomplex und aus über Thioestergruppen kovalent gebundenen Fettsäuren [205,206]. Außerdem findet man im Haar „freie Lipide“, die sich zwar im Inneren des Haares befinden, aber nur durch intermolekulare Wechselwirkungen gebunden sind. Die beim Extrahieren des Haars erhaltenen Lipide bestehen hauptsächlich aus eingelagertem Sebum und

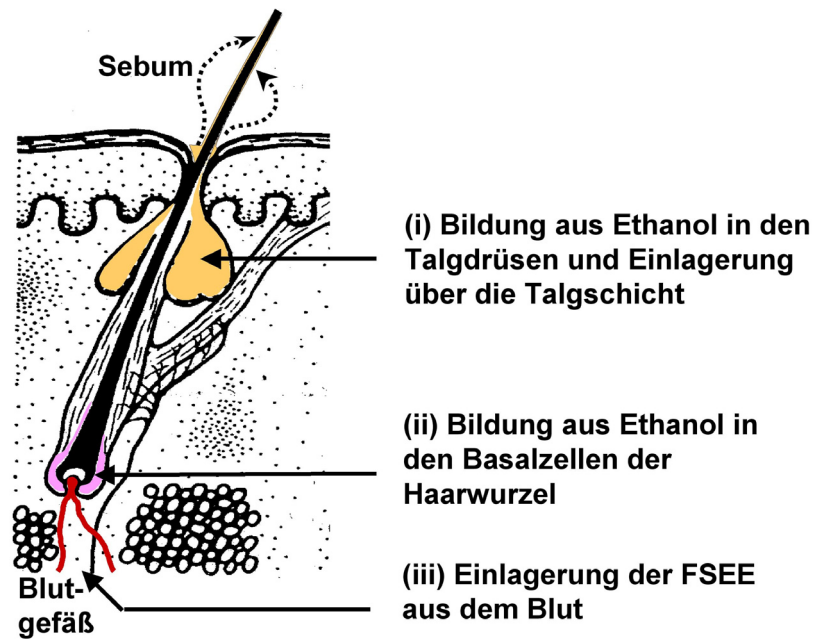


Abb. 30: Mögliche Einlagerungswege für FSEE in das Haar.

internen freien Lipiden. Bei Extraktion mit sehr unpolaren Lösungsmitteln können auch Teile der Strukturlipide des Zellmembrankomplexes herausgelöst werden. Insgesamt ergibt sich ein Lipidanteil der Haare von ca. 1-9 Gew.-% [144]. Die Zusammensetzung dieser Lipide entspricht ungefähr der des Sebums. Es ist anzunehmen, dass Sebumbestandteile und im Sebum gelöste Stoffe durch Diffusion mit dem Konzentrationsgefälle ins Innere des Haares gelangen und dort gespeichert werden können. Im Wesentlichen kommen daher für die FSEE die drei in Abb. 30 dargestellten Einlagerungswege infrage:

- (i) Die FSEE werden in den Talgdrüsen, die in die Haarkanäle münden, aus Ethanol gebildet und erst nachträglich aus dem Sebum in das fertige Haar eingelagert.
- (ii) Sie werden in den Basalzellen der Haarwurzel durch Veresterung mit Ethanol gebildet, das über den Blutkreislauf auch in diese Zellen gelangt. Die vielfältige synthetische Aktivität dieser Zellen bietet hierfür gute Voraussetzungen. Auch die Diffusion von FSEE aus angrenzendem Hautgewebe in die Basalzellen ist möglich.
- (iii) Sie können, wie es auch für viele Drogen angenommen wird, als fertige Moleküle über den Blutkreislauf in die Haarwurzel gelangen und in den sich rasch teilenden und schließlich keratinisierenden Zellen eingeschlossen werden.

Eine Einlagerung aus dem Schweiß ist für diese lipophilen Verbindungen unwahrscheinlich. Auf die Problematik der Kontamination durch haarkosmetische Produkte, die Ethanol oder FSEE enthalten können, wird in Abschnitt 4.3.2 gesondert eingegangen.

Bereits in Abschnitt 4.1.4 wurde gezeigt, dass in den Haarextrakten auch ungeradzahlige und in Iso- bzw. Anteiso-Position verzweigte Ester, die typisch für Sebum sind, nachgewiesen werden können und in den n-Heptan-Waschflüssigkeiten ähnliche Konzentrationsverhältnisse der Ester zueinander wie in den Haarextrakten gefunden werden. Um die hieraus gefolgerte Annahme, dass der Weg über das Sebum (Mechanismus (i)) am stärksten an der Einlagerung der FSEE beteiligt ist, zu überprüfen, wurden Untersuchungen durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

4.2.1 Segmentweise Haaruntersuchungen auf FSEE

Eine größere Zahl an Haarproben wurde in mehreren Abschnitten untersucht. Die einbezogenen Probanden wurden in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe A bestand aus 19 Alkoholikern, die sich einer freiwilligen stationären Entziehungsbehandlung unterzogen hatten, Gruppe B aus 10 Todesfällen mit bekanntem und durch Obduktionsergebnisse bestätigtem chronisch erhöhtem Alkoholkonsum zu Lebzeiten, Gruppe C aus 13 Normaltrinkern mit einer per Fragebogen erfassten Trinkmenge von bis zu 20 g Ethanol/Tag und Gruppe D aus 5 Abstinenzlern. Die Haarproben wurden je nach Länge und Gewicht in 2 bis 12 Segmente aufgeteilt. Drei Proben wurden in gesamter Länge untersucht, da nicht genügend Material für eine Segmentierung zur Verfügung stand. Da in der Haaranalytik die Sicherheit der zeitlichen Zuordnung eines Segments generell mit zunehmendem Abstand von der Haut abnimmt, wurden die Segmente im Verlauf von proximal nach distal länger werdend gewählt. Die Segmentlängen betrugen im kopfnahen Bereich ca. 1-2,5 cm und bei langem Haar im distalen Bereich bis zu 12 cm. Jedes Segment wurde vor der Extraktion zunächst mit 2 x 1 ml n-Heptan gewaschen und sowohl die Waschflüssigkeiten als auch die n-Heptan/DMSO-Extrakte auf FSEE untersucht (vgl. Abschnitt 3.4.1). Dabei wurden nur die vier in der höchsten Konzentration vorkommenden FSEE C14-Et, C16-Et, C18 Δ^9 -Et und C18-Et erfasst. Mit e-FSEE (externe FSEE) werden im Folgenden die FSEE auf der Haaroberfläche bezeichnet, die beim Waschen mit n-Heptan abgelöst wurden, i-FSEE (interne FSEE) steht für die bei der anschließenden Extraktion mit dem zweiphasigen n-Heptan/DMSO-Gemisch extrahierten FSEE. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auch für die Lipide aus der Waschflüssigkeit immer auf das Gewicht der Haarprobe. In den Tabellen 10 bis 13 ist ein Teil der auf diese Weise erhaltenen Daten für die Gruppen A bis D dargestellt. Die Tabellenspalte ganz rechts zeigt den Verlauf der FSEE-Summenkonzentrationen in Form kleiner Graphiken (x-Achse: Abstand von der Kopfhaut; y-Achse:

c_{FSEE}), die unterschiedlichen Segmentlängen blieben dabei unberücksichtigt. Neben Daten zum Trinkverhalten (falls vorhanden) und der Haarlänge sind auch die $c_{\text{i-FSEE}}$ und $c_{\text{e-FSEE}}$ für den kopfnahen Abschnitt von 6 cm Länge angegeben, die aus den gemessenen Segmentkonzentrationen berechnet wurden. Für Haar, das kürzer als 6 cm war, wurde der Mittelwert über die Gesamtlänge eingesetzt.

Bei Vergleich des von den Probanden berichteten Trinkverhaltens mit den bei der segmentweisen Untersuchung erhaltenen FSEE-Konzentrationen ließ sich keine zeitliche Übereinstimmung in den zugehörigen Haarsegmenten feststellen. Dies soll an zwei Beispielen verdeutlicht werden. In Abb. 31 sind die $c_{\text{i-FSEE}}$ und $c_{\text{e-FSEE}}$ der 31 cm langen Haarprobe eines Alkoholikers (Fall-Nr. HV01) dargestellt, der über einen längeren Zeitraum 200-300 g Ethanol pro Tag konsumiert hatte und 8 Tage vor Probennahme den Alkoholkonsum vollständig einstellte. Im Verlauf der ersten 12 cm ist ein starker Anstieg der $c_{\text{i-FSEE}}$ zu beobachten, obwohl in den letzten Monaten das Trinkverhalten nahezu konstant war. Danach fallen die Werte langsam ab. Für die e-FSEE liegt das Konzentrationsmaximum weiter distal. Dieser Verlauf wurde qualitativ bei allen Probanden der Gruppe A, die ihr Trinkverhalten über einen längeren Zeitraum nicht geändert hatten, gefunden. Bemerkenswert ist, dass auch in Haarproben von Patienten aus Gruppe A, die nach einer längeren

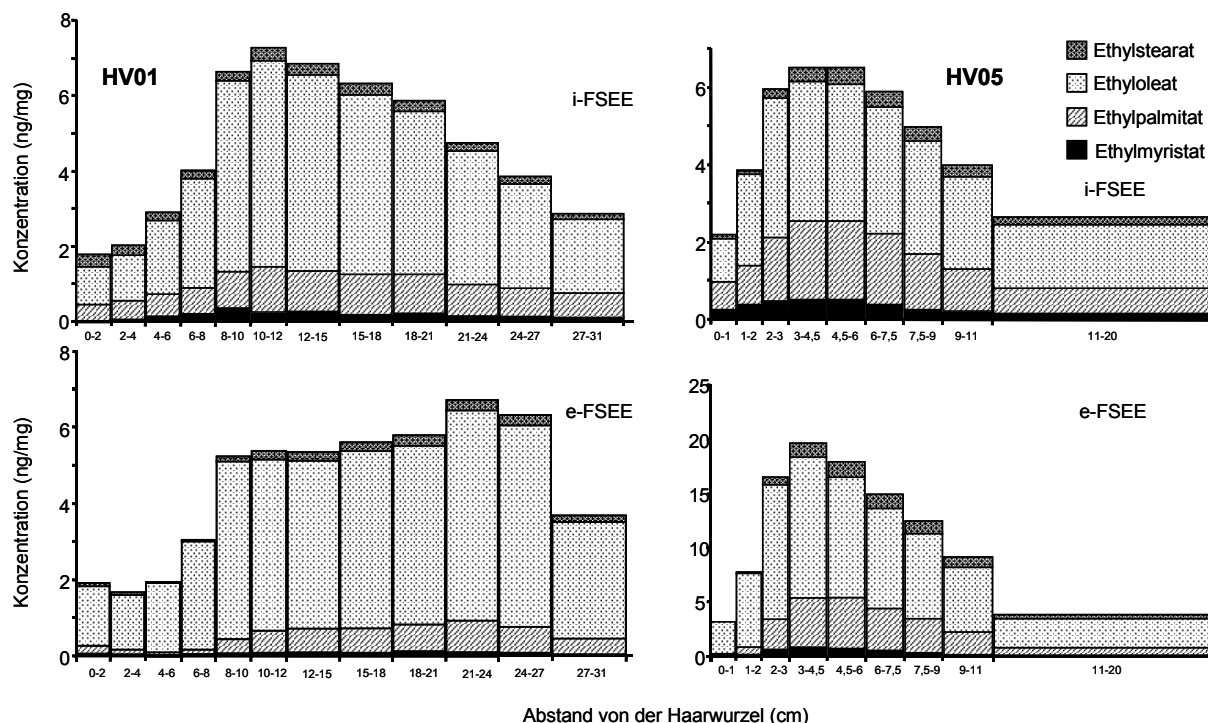









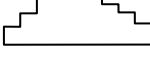
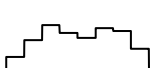
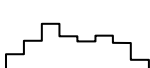

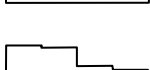
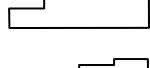
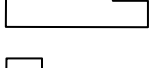



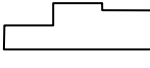
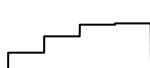
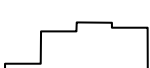
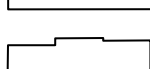
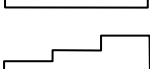
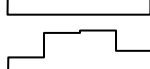
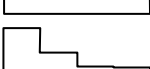
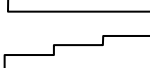

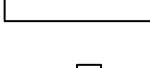
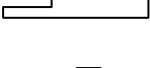






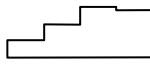
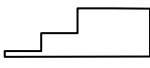


Abb. 31: Konzentrationsprofile im Haar zweier Alkoholentzugspatienten (HV01 und HV05) für aus dem Haar extrahierte FSEE (i-FSEE) und aus den n-Heptan-Waschlösungen erhaltene FSEE (e-FSEE).

Abstinenzphase kurze Zeit vor der Probennahme einen 2- bis 5-wöchigen Rückfall hatten, ähnliche Konzentrationsverläufe gefunden wurden. Abb. 31 rechts zeigt einen solchen Fall (HV05), der nach 14 Monaten Abstinenz für zwei Wochen eine tägliche Alkoholmenge von 400 g konsumiert hatte. Zwischen erneutem Abstinenzbeginn und Probennahme lagen 3 Tage. Auch bei den Todesfällen (Gruppe B) und den Gruppen C und D (Normaltrinker und Abstinenzler) zeigte sich für die Mehrzahl der Fälle ein solches Konzentrationsprofil. Dieser in den meisten Fällen zu beobachtende deutliche Anstieg der Konzentrationen von kopfnahen zu weiter von der Kopfhaut entfernten Segmenten sowohl für die i -FSEE als auch für die e -FSEE deutet auf eine Akkumulation der FSEE mit zunehmendem Alter des Haares, d. h. Abstand von der Haarwurzel, durch fortgesetzten Eintrag aus dem Sebum hin. Für die wenigen Fälle, bei denen für $c_{i\text{-FSEE}}$ der typische Anstieg von proximal nach distal nicht gefunden wurde (z. B. SH04 und SH09 aus Tabelle 12), kann eine fehlende Konstanz im Trinkverhalten als Erklärung herangezogen werden. Bei einigen Fällen wichen die Profile für die $c_{e\text{-FSEE}}$ von denen der $c_{i\text{-FSEE}}$ ab. Dies kann mit Unterschieden in der Häufigkeit und Art der Haarwäsche zusammenhängen. Die völlig fehlende Korrelation der Segmentkonzentrationen mit dem Trinkverhalten in der entsprechenden Zeit ist ebenfalls als starker Hinweis darauf zu werten, dass die Einlagerung auf diesem Wege stattfindet.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse für die vier Gruppen von Probanden zusammengefasst. Die $c_{i\text{-FSEE}}$ liegen für die Alkoholiker (Gruppe A und B) mit Ausnahme der Proben HV07 und HV08 um 1 ng/mg oder höher und somit in einem typischen Bereich für exzessiven Alkoholkonsum (vgl. Abschnitt 4.3.1). Während bei HV08 der niedrige Wert durch die 2-monatige Abstinenz vor der Probennahme erklärt werden kann, fehlt eine solche Erklärung für HV07. Möglicherweise lag hier eine Stoffwechselstörung vor, die mit verminderter Sebumsekretion einhergeht. Es fällt auf, dass der Mittelwert der $c_{i\text{-FSEE}}$ in Gruppe B mit 6,8 ng/mg deutlich über dem von Gruppe A (3,6 ng/mg) liegt. Gleichzeitig übersteigt der Mittelwert der $c_{e\text{-FSEE}}$ von Gruppe B (27,7 ng/mg) den entsprechenden Wert von Gruppe A (3,9 ng/mg) um ein Vielfaches. Die vergleichsweise hohen $c_{e\text{-FSEE}}$ bei Gruppe B können darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei den Todesfällen zum Großteil um Personen handelte, die stark verwahrlost waren und keine regelmäßige Haarpflege mehr betrieben. Dies kann unter Annahme des Einlagerungsweges über das Sebum auch die relativ zu Gruppe A erhöhten $c_{i\text{-FSEE}}$ erklären, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass in Gruppe B zusätzlich auch ein höherer durchschnittlicher Alkoholkonsum stattge-

Tabelle 10: Angaben der Patienten in Entzugsbehandlung (Gruppe A) zum Trinkverhalten und Ergebnisse der segmentweisen Untersuchung der Haarproben auf FSEE.

Fall-Nr.	Trinkmenge EtOH/Tag und Trinkgeschichte lt. Patientenangaben	Abstinenz vor Probenahme in Tagen ^a	Haarlänge in cm / Anzahl der Segmente ^b	c _i -FSEE (0-6 cm) ^c in ng/mg	c _e -FSEE (0-6 cm) ^c in ng/mg	Konzentrationsprofil von proximal nach distal ^d	
						i-FSEE	e-FSEE
HV01	200-300 g seit langem	8	31 / 12	2,2	1,8		
HV02	120-140 g seit langem	7	9 / 5	2,0	0,73		
HV03	170-210 g seit langem	28	8 / 6	1,3	0,92		
HV04	120 g seit langem	2	9 / 6	4,3	3,8		
HV05	400 g 2-wöch. Rückfall nach 14 Monaten Abstinenz	3	20 / 9	5,1	13,1		
HV06	350-500 g 2-wöch. Rückfall nach 3 Jahren Abstinenz	14	25 / 8	0,97	0,73		
HV07	260-300 g seit 4 Monaten, davor 90 g	16	9 / 4	0,20	1,2		
HV08	60-80 g seit langem	60	9,5 / 4	0,35	1,2		
HV09	90 g seit 3 Monaten, davor 90-220 g	7	8 / 3	9,6	6,3		
HV10	180 g 5-wöch. Rückfall nach 2 Jahren Abstinenz	7	11 / 4	3,6	2,4		
HV11	100-120 g seit langem	7	7,5 / 3	1,9	0,83		
HV12	190-430 g seit 4 Monaten	2	23 / 4	7,4	11,4		
HV13	> 180 g seit 1 Monat, davor 40 g	3	7 / 3	4,6	6,6		
HV14	50-60 g seit 6 Monaten nach 3 Monaten Abstinenz	4	15 / 6	7,5	6,6		
HV15	200 g seit langem	7	5,5 / 3	0,92	0,29		
HV16	200 g seit langem	6	17 / 6	1,6	0,25		
HV17	180-360 g 2-wöch. Rückfall nach 10 Monaten Abstinenz	4	8 / 4	11,6	13,5		
HV18	90-150 g seit langem	2	9,5 / 6	1,3	1,3		
HV19	220 g seit 1 Monat nach 3-wöch. Abstinenz, davor 120 g	6	5 / 2	1,4	0,7		



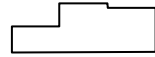
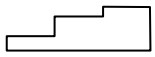
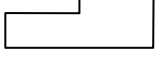
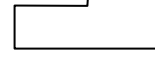
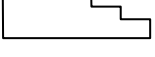
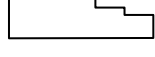
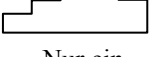
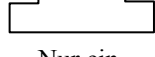


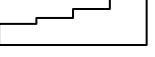
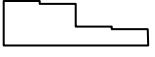
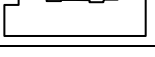

a) Abstinenztage vor der Probenahme. In den meisten Fällen Abstinenzbeginn bei der stationären Aufnahme.

b) Die Segmentlänge wurde von proximal nach distal länger werdend gewählt.

c) Aus den Segmentkonzentrationen berechnete Konzentrationssummen der vier Ester für das Segment 0-6 cm von der Kopfhaut.

d) Schematischer Verlauf der Konzentrationssummen von proximal nach distal. Variierende Segmentlängen sind nicht berücksichtigt.

Tabelle 11: Ergebnisse der segmentweisen Untersuchung der Haarproben auf i-FSEE und e-FSEE der Gruppe B (Todesfälle mit bekanntem exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten).

Fall-Nr.	Haarlänge in cm / Anzahl der Segmente ^a	c _i -FSEE (0-6 cm) ^b in ng/mg	c _e -FSEE (0-6 cm) ^b in ng/mg	Konzentrationsprofil von proximal nach distal ^c	
				i-FSEE	e-FSEE
436/00	27 / 6	2,5	3,3		
441/00	6 / 3	4,4	27,3		
460/00	5 / 2	6,1	28,8		
004/01	10 / 5	4,4	10,9		
018/01	11 / 5	10,8	44,1		
029/01	7 / 1	7,1	32,9	Nur ein Segment	Nur ein Segment
043/01	12 / 1	13,5	39,3	Nur ein Segment	Nur ein Segment
054/01	18 / 6	3,2	42,7		
059/01	6,5 / 4	4,8	14,0		
063/01	13 / 10	11,1	33,8		

a) Die Segmentlänge wurde von proximal nach distal länger werdend gewählt.




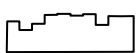
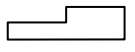
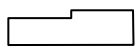
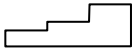
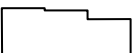
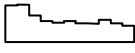
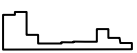
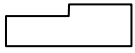

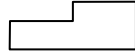
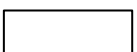

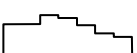
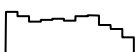


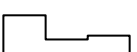




b) Aus den Segmentkonzentrationen berechnete Konzentrationssummen der vier Ester für das Segment 0-6 cm von der Kopfhaut.

c) Schematischer Verlauf der Konzentrationssummen von proximal nach distal. Variierende Segmentlängen sind nicht berücksichtigt.

funden hatte. Die Werte der Gruppen C und D liegen deutlich niedriger als die der Gruppen A und B. Dass in Gruppe C einige Individuen relativ hohe Konzentrationen an e-FSEE aufweisen, kann zumindest für die Fälle HV02, HV05, HV08 und HV09 damit begründet werden, dass wenige Tage vor Probennahme von diesen Probanden im Rahmen von Silvesterfeiern einmalig größere Mengen Alkohol aufgenommen wurden als in den Monaten davor.

In praktisch allen Alkoholikerhaarproben ist Ethyloleat der dominierende FSEE. Ethylpalmitat liefert den zweithöchsten Beitrag, die anderen beiden Ester tragen nur in geringem Maße zur Gesamtkonzentration bei. Generell stellt das Ethyloleat bei den e-FSEE einen deutlich größeren Anteil als bei den i-FSEE. Diese Unterschiede in den Konzentrationsverhältnissen der FSEE untereinander zwischen den äußeren Lipiden und den aus der

Tabelle 12: Angaben zum Trinkverhalten und Ergebnisse der segmentweisen Untersuchung der Haarproben auf FSEE für Gruppe C (Normaltrinker bis 20 g/Tag).

Fall-Nr.	Trinkmenge EtOH/Tag laut Probandenangaben	Haarlänge in cm / Anzahl der Segmente ^a	c _i -FSEE (0-6 cm) ^b in ng/mg	c _e -FSEE (0-6 cm) ^b in ng/mg	Konzentrationsprofil von proximal nach distal ^c	
					i-FSEE	e-FSEE
SH13	Kein Alkohol in den letzten Monaten, davor gelegentlich	30 / 6	0,47	0,83		
VA03	6 g	39 / 10	0,35	0,17		
VA04	12 g	5 / 2	0,20	0,31		
SH02	2 g; 30 g drei Tage vor Probennahme	4,5 / 3	0,26	1,45		
SH03	Nur zu besonderen Anlässen, 20 g sechs Tage vor Probennahme	8,5 / 1	0,29	0,15	Nur ein Segment	Nur ein Segment
SH04	Nur zu besonderen Anlässen, 50 g ein Tag vor Probennahme	43 / 11	0,43	0,65		
SH05	16 g; 192 g ein Tag vor Probennahme	3,5 / 2	0,25	0,59		
SH06 ^d	Nur gelegentlich	3,5 / 2	0,24	2,8		
SH08	Nur zu besonderen Anlässen, 45 g zwei Tage vor Probennahme	16 / 7	0,61	0,98		
SH09	6 g; 100 g drei Tage vor Probennahme	41 / 11	0,75	1,77		
SH11	3 g; 40 g drei Tage vor Probennahme	8,5 / 3	0,35	0,25		
SH12	3 g; 65 g vier Tage vor Probennahme	28,5 / 5	0,85	0,58		
SH15	2 g	17,5 / 6	0,28	2,71		

a) Die Segmentlänge wurde von proximal nach distal länger werdend gewählt.

b) Aus den Segmentkonzentrationen berechnete Konzentrationssummen der vier Ester für das Segment 0-6 cm von der Kopfhaut.

c) Schematischer Verlauf der Konzentrationssummen von proximal nach distal. Variierende Segmentlängen sind nicht berücksichtigt.

d) Häufige Anwendung verschiedener Haarkosmetika, darunter auch ethanolhaltige.

Haarmatrix erhaltenen Extrakten weisen darauf hin, dass auch die beiden alternativen Mechanismen (ii) und (iii) einen Beitrag zur Einlagerung leisten. Allerdings ist dieser Beitrag als eher gering einzuschätzen, da der Hauptunterschied in dem in den Haarex-

Tabelle 13: Ergebnisse der segmentweisen Untersuchung der Haarproben von Gruppe D (Abstinenzler) auf interne und externe FSEE.

Fall-Nr.	Haarlänge in cm / Anzahl der Segmente ^a	c_i-FSEE (0-6 cm) ^b in ng/mg	c_e-FSEE (0-6 cm) ^b in ng/mg	Konzentrationsprofil von proximal nach distal ^c	
				i-FSEE	e-FSEE
VA01	13 / 3	0,09	0,07		
VA02	7 / 2	0,17	0,08		
SH01 ^d	17,5 / 7	0,37	1,4		
VA05	8 / 4	0,10	0,13		
VA06	6 / 3	0,06	0,04		

- a) Die Segmentlänge wurde von proximal nach distal länger werdend gewählt.
b) Aus den Segmentkonzentrationen berechnete Konzentrationssummen der vier Ester für das Segment 0-6 cm von der Kopfhaut.
c) Schematischer Verlauf der Konzentrationssummen von proximal nach distal. Variierende Segmentlängen sind nicht berücksichtigt.
d) Friseur, beruflich bedingte Alkoholdampf-Exposition (Haarsprays etc.).

Tabelle 14: Vergleich der Gesamtkonzentrationen der i-FSEE und der e-FSEE sowie der Konzentrationsverhältnisse der vier Ester, gemessen im Haar von vier Probandengruppen (A: 19 Alkoholiker in Entzugsbehandlung, B: 10 Todesfälle mit Alkoholanamnese, C: 13 Normaltrinker, D: 5 Abstinenzler). Die Angaben beziehen sich auf das kopfnähe Segment (0-6 cm) und wurden aus den Segmentkonzentrationen errechnet.

Gruppe	Konzentrationen in ng/mg		i-FSEE Verteilung in %				e-FSEE Verteilung in %			
	c_i-FSEE	c_e-FSEE	C14- Et	C16- Et	C18Δ⁹- Et	C18- Et	C14- Et	C16- Et	C18Δ⁹- Et	C18- Et
A Bereich	0,35-11,6	0,27-13,5	3-14	20-41	32-66	2-13	0-8	0-41	40-100	0-18
Mittelwert	3,57	3,88	7	31	53	9	4	20	70	7
B Bereich	2,5-13,5	3,3-42,7	3-22	19-39	35-72	4-9	1-17	5-36	42-95	1-7
Mittelwert	6,79	27,7	10	31	54	6	5	16	76	4
C Bereich	0,20-0,85	0,15-2,71	9-39	21-52	23-50	4-14	6-16	20-53	23-71	3-12
Mittelwert	0,41	1,02	19	40	33	8	11	36	47	7
D Bereich	0,06-0,37	0,04-1,4	5-33	21-41	27-56	5-17	4-16	18-47	27-66	5-15
Mittelwert	0,16	0,34	18	33	37	13	11	31	47	11

trakten gegenüber den äußeren Lipiden verringerten Anteil an Ethyloleat bestand, der auch durch die relative Instabilität dieser ungesättigten Verbindung gegenüber oxidativen Einflüssen oder eine schnellere Auswaschung erklärt werden könnte.

Die Wägung der Waschrückstände ergab für die äußerlich am Haar anhaftenden Lipide Gewichte zwischen < 0,1 und 12 % der Haareinwaage. Da die auf das Haargewicht bezo-

genen FSEE-Konzentrationen in der äußeren Lipidschicht und in der Haarmatrix die gleiche Größenordnung wie die c_{i-FSEE} aufweisen, folgt, dass die Konzentrationen der e-FSEE bezogen auf das Gewicht der Waschrückstände in den meisten Fällen um ca. zwei Größenordnungen höher liegen. Dies ist als weiterer Hinweis darauf zu werten, dass die Einlagerung der FSEE aus dem Sebum erfolgt, da aufgrund des Konzentrationsgradienten eine Diffusion der FSEE von der Haaroberfläche entlang des Zellmembrankomplexes in die Haarstruktur stattfinden kann.

4.2.2 Squalenkonzentrationen im Haar

Squalen ist in den extrahierbaren Haarlipiden des die ersten 6 cm umfassenden Segments im Mittel zu einer Konzentration von ca. $0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ Haar enthalten (die gemessenen Werte lagen zwischen $0,1$ und $2,97 \mu\text{g}/\text{mg}$, vgl. Abschnitt 4.4). Bei segmentweiser Untersuchung von Haarproben zeigen die Konzentrationen in den Haarextrakten für Squalen einen qualitativ ähnlicher Verlauf wie die c_{i-FSEE} , wobei die Konzentrationsmaxima für längere Haarproben meist zu kopfnäheren Segmenten hin verschoben sind (vgl. Abb. 40 in Abschnitt 4.4). Es kann angenommen werden, dass Squalen nicht oder nur zu einem sehr geringen Teil bereits in der Haarwurzel in das Haar eingelagert wird, da sonst kein genereller Anstieg von proximal nach distal festzustellen sein dürfte, wie er in der Regel gefunden wurde. Bei einem Squalengehalt des Sebums von 10-20 % bedeutet dies, dass Haar im Mittel ca. 0,4 % (zwischen 0,1 und 1,5 %) seines Eigengewichts an Sebum aufnimmt. Die im Vergleich zum Sebum um ca. zwei Größenordnungen niedriger liegenden FSEE-Konzentrationen im Haar lassen sich somit unter Annahme der Einlagerung aus dem Sebum zwanglos erklären, was als eine weitere Bestätigung für diesen Einlagerungsweg zu sehen ist.

4.2.3 Untersuchungen von Pflaster- und Wischtests

Zur Untersuchung von Hautoberflächenlipiden auf FSEE und Squalen wurden mit Hilfe von Pflaster- und Wischtests Versuche durchgeführt, die in Abschnitt 4.7 näher beschrieben werden. Es ergab sich, dass FSEE in den Oberflächenlipiden der Haut, die in erster Linie aus Sebum bestehen, nachweisbar sind. Squalen wurde bei diesen Untersuchungen immer parallel bestimmt, da aufgrund der bei dieser Art der Probennahme stark schwankenden erhaltenen Lipidmengen die Einbeziehung eines weiteren Hautlipidbestandteils als Bezugsgröße unerlässlich war. Die auf Squalen bezogenen relativen FSEE-Konzentratio-

nen (c_{i-FSEE}/c_{SQ}) lagen in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie die bei Untersuchung der Lipidextrakte aus dem Haar erhaltenen (vgl. Abschnitt 4.4 und 4.7). Auch dieses Ergebnis ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Einlagerung der FSEE und des Squalens ins Haar hauptsächlich über das Sebum stattfindet.

4.3 Einflussgrößen auf die FSEE-Konzentrationen im Haar

Im Folgenden sollen die Untersuchungsergebnisse zu verschiedenen Faktoren, die Einfluss auf die FSEE-Konzentrationen im Haar nehmen können, diskutiert werden. Neben dem Trinkverhalten der Probanden werden sowohl störende Effekte durch haarkosmetische Behandlungen als auch die Abhängigkeit von der Haarart berücksichtigt.

4.3.1 Trinkverhalten

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Trinkverhalten der Probanden und den FSEE-Konzentrationen im Haar besteht, wurden zunächst Haarproben von 6 Abstinenzlern, 17 Normaltrinkern, 19 Alkoholikern in stationärer Entzugsbehandlung und 22 postmortal entnommene Proben von im Institut für Rechtsmedizin der Charité obduzierten Todesfällen mit aus der Vorgeschichte bekanntem exzessivem Alkoholkonsum untersucht. Die Ergebnisse wurden größtenteils bereits in den Tabellen 10-13 dargestellt. Zusätzlich wurden 5 Probanden, die zuvor wegen Alkohol im Straßenverkehr aufgefallen waren und einer Fahreignungsprüfung unterzogen werden sollten, mit einbezogen. In Abb. 32 sind die Untersuchungsergebnisse graphisch dargestellt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das kopfnähe Segment von maximal 6 cm Länge.

Bei Setzen eines Cut-off-Wertes von 1 ng/mg, der in Abb. 32 als gestrichelte Linie eingezeichnet ist, ließ sich für die Summe der Konzentrationen von C14-Et, C16-Et, C18 Δ^9 -Et und C18-Et mit wenigen Ausnahmen zwischen der Gruppe mit chronisch exzessivem Alkoholkonsum und Normaltrinkern bzw. Abstinenzlern klar unterscheiden. Die Proben der Abstinenzler ergaben in der Regel Konzentrationen unter 0,4 ng/mg.

In den Fällen mit detaillierten Trinkangaben aus der Gruppe der Normaltrinker konnte unter Einbeziehung der Abstinenzler und weiterer Probanden (insgesamt 56 Personen) allerdings keine Korrelation zwischen den erfassten Trinkmengen (zwischen 0 und 43 g Alkohol pro Tag) und den FSEE-Konzentrationen im Haar festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass im unteren bis mittleren Konzentrationsbereich Schwankungen durch Unterschiede in Haarbehandlung und/oder Hauttyp etc. relativ stark ins Gewicht fallen.

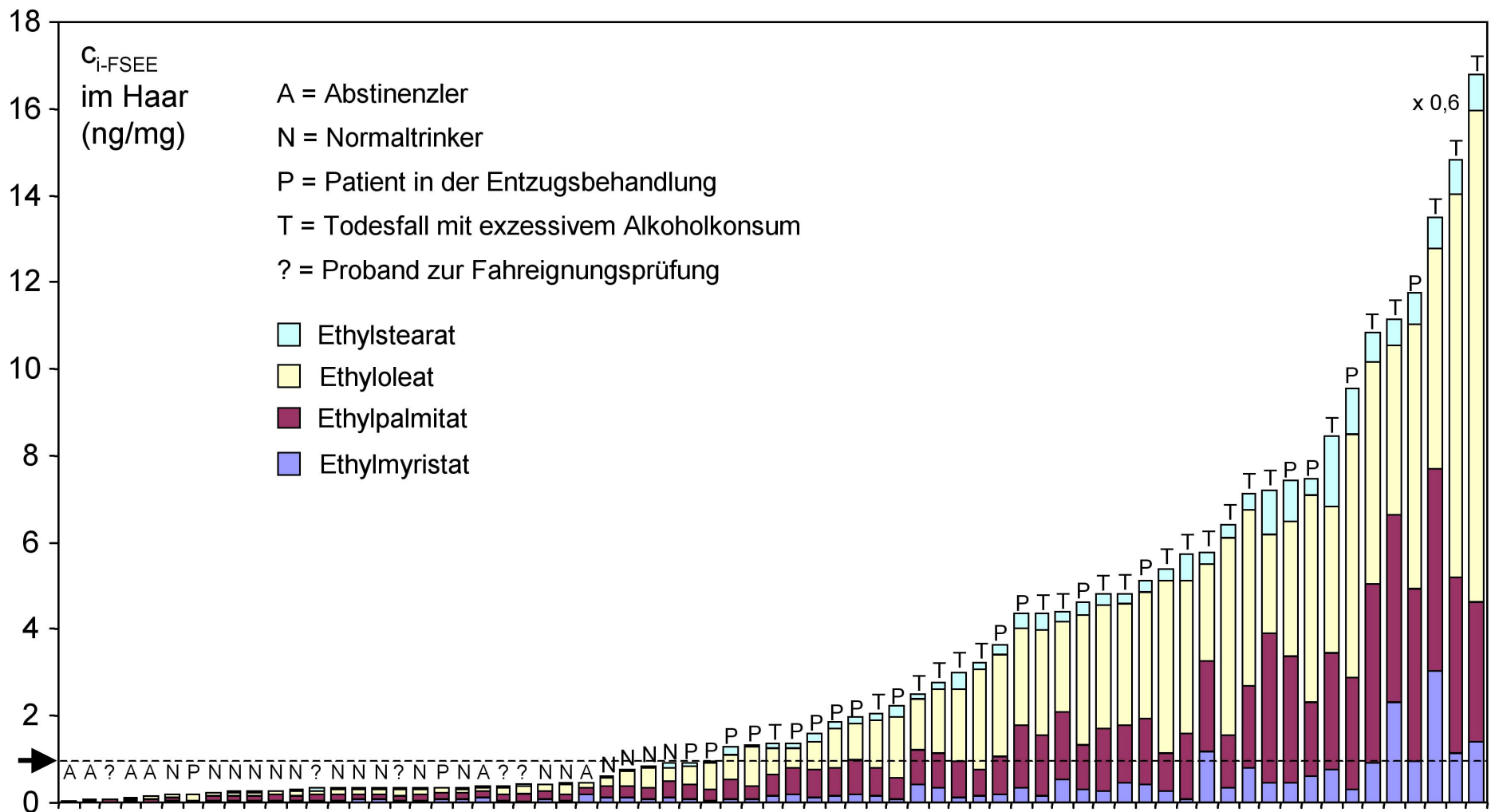


Abb. 32: Nach Extraktion des zuvor gewaschenen Haars erhaltene Haarkonzentrationen (c_{i-FSEE}) für Probanden aus verschiedenen Konsumentengruppen. Der Cut-off-Wert für c_{i-FSEE} von 1 ng/mg ist mit Pfeil und gestrichelter Linie markiert. Untersuchte Haarlänge: 6 cm oder kürzer, bei segmentweise untersuchten längeren Haarproben wurden die durch gewichtete Mittelwertbildung erhaltenen Werte für den Abschnitt von 0-6 cm von der Kopfhaut dargestellt.

Auch die Haarproben der Kinder-/Abstinenzlergruppe wiesen geringe Konzentrationen an FSEE auf, die allerdings für die Proben von Kleinkindern durchweg unter 0,1 ng/mg lagen. Vermutlich sind diese geringen Konzentrationen auf die Bildung von FSEE aus endogenem Ethanol in den Sebumdrüsen, in denen neben anderen Verbindungen auch Fettalkohole gebildet werden, oder aber auf direkten Eintrag von Ethanol bzw. FSEE ins Haar durch Shampoo oder Haarpflegemittel zurückzuführen. Auch die Bildung endogenen Ethanols im Verdauungstrakt [207,208] mit anschließender Veresterung vorhandener Fettsäuren ist möglich, allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass die auf diesem Wege erreichten Blutalkoholkonzentrationen von maximal 0,035 mg/g (Median 0,0004 mg/g, n = 1557) [209] ausreichend hoch sind. Durch physiologische Reduktion von Acetat könnten schließlich in den Sebumdrüsen geringe Mengen Ethanol entstehen, da dort bei der Lipidsynthese auch Fettsäuren in Fettalkohole umgewandelt werden. Geringe Mengen FSEE konnten von Chan et al. auch in Meconium von Neugeborenen, deren Mütter während der gesamten Schwangerschaft strikt abstinente waren, nachgewiesen werden [210]. Meconiumproben von Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft Alkohol konsumiert hatten, wiesen dagegen deutlich höhere Werte auf [211].

Bei einigen wenigen Fällen führt die Verwendung des Cut-off-Wertes von 1 ng/mg somit zu einer falschen Zuordnung. Auf mögliche Gründe hierfür und Möglichkeiten, solche Fälle im Vorfeld zu erkennen, soll in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

4.3.2 Haarkosmetische Behandlungen

Um den Einfluss verschiedener haarkosmetischer Behandlungen auf die FSEE-Konzentrationen im Haar zu untersuchen, wurden mehrere Experimente unter Verwendung handelsüblicher Haarkosmetika durchgeführt. Neben wiederholter Haarwäsche und der Anwendung von Haarwachs bzw. Haarwasser wurden Behandlungen wie Dauerwelle, Tönung, Färbung und Bleichung des Haars durchgeführt und jeweils vor und nach der Behandlung die FSEE-Konzentrationen sowohl im Haarextrakt (i-FSEE) als auch in den n-Heptan-Waschlösungen (e-FSEE) bestimmt.

4.3.2.1 Tönung

Die Haarprobe eines Alkoholikers wurde mit einem Tönungsgel (pH 5, Einwirkzeit 20 Minuten) nach Anwendungsvorschrift behandelt. Das Gel enthielt 2-Amino-6-chlor-4-nitrophenol als farbgebenden Bestandteil. Nach Tönung zeigte sich eine um 3,6 % ernied-

richtige Gesamtkonzentration der vier untersuchten FSEE im Haarextrakt gegenüber einer um 54,6 % geringeren Konzentrationssumme in der Waschlösung (vgl. Abb. 33 a, links oben). Der Einfluss dieses und ähnlich zusammengesetzter handelsüblicher Tönungsprodukte auf die untersuchten FSEE in der Haarmatrix ist erwartungsgemäß gering, da das Haar vor und während der Behandlung nicht aufquillt und sich die Farbstoffe lediglich in der Cuticula anlagern. Der höhere Verlust von FSEE in der Waschflüssigkeit ist durch die im verwendeten Tönungsgel zur besseren Benetzung der Haare eingesetzten Tenside zu erklären, die den Lipidfilm auf der Haaroberfläche teilweise entfernen.

4.3.2.2 Intensivtönung (Coloration)

Bei der Coloration der Haarprobe eines Alkoholikers mit einer Mischung aus einer Tönungscreme und einer Oxidationslösung (pH 11, Einwirkzeit 20 Minuten) zeigten sich ähnlich wie bei der Tönung nur geringe Effekte auf die Konzentrationen der i-FSEE. Im Haarextrakt betrug der Verlust der Konzentrationssumme der vier untersuchten Ester 11,8 % (s. Abb. 33 b, rechts oben). Der entgegen der Erwartung relativ gering ausfallende Verlust an FSEE in der Waschlösung von nur ca. 8 % kann sich aus Inhomogenitäten der verwendeten Haarprobe und/oder der geringen lipidlösenden Wirkung der verwendeten Reagenzien erklären.

4.3.2.3 Färbung

Die Haarprobe eines Alkoholikers wurde unter Verwendung einer Haarfarbe mit Oxidationsemulsion (pH 11, Einwirkzeit 45 Minuten) gefärbt. Die Mischung enthielt 2,5-Diaminotoluol und 2-Amino-6-chlor-4-nitrophenol als färbende Bestandteile, Ammoniak sowie 6 % Wasserstoffperoxid. Nach der Färbung fand sich eine um rund 64 % niedrigere Summe der untersuchten FSEE im Haarextrakt gegenüber 97 % Verlust in der Waschflüssigkeit (der Ausgangswert war bei dieser Probe mit ca. 70 ng/mg außergewöhnlich hoch). Dabei veränderte sich in dem Haarextrakt im Gegensatz zu der externen Lipidschicht (Waschflüssigkeit) das Verhältnis der FSEE zueinander nicht (s. Abb. 33 c, links unten). In der Waschflüssigkeit zeigte sich ein höherer Anteil von Ethylpalmitat nach der Färbung, Ethyloleat hatte demgegenüber einen wesentlich geringeren Anteil an der Gesamtkonzentration der untersuchten FSEE als zuvor. Der große Verlust im Haarextrakt erklärt sich durch den Einsatz von Oxidationsfarbstoffen in Verbindung mit Wasserstoffperoxid und

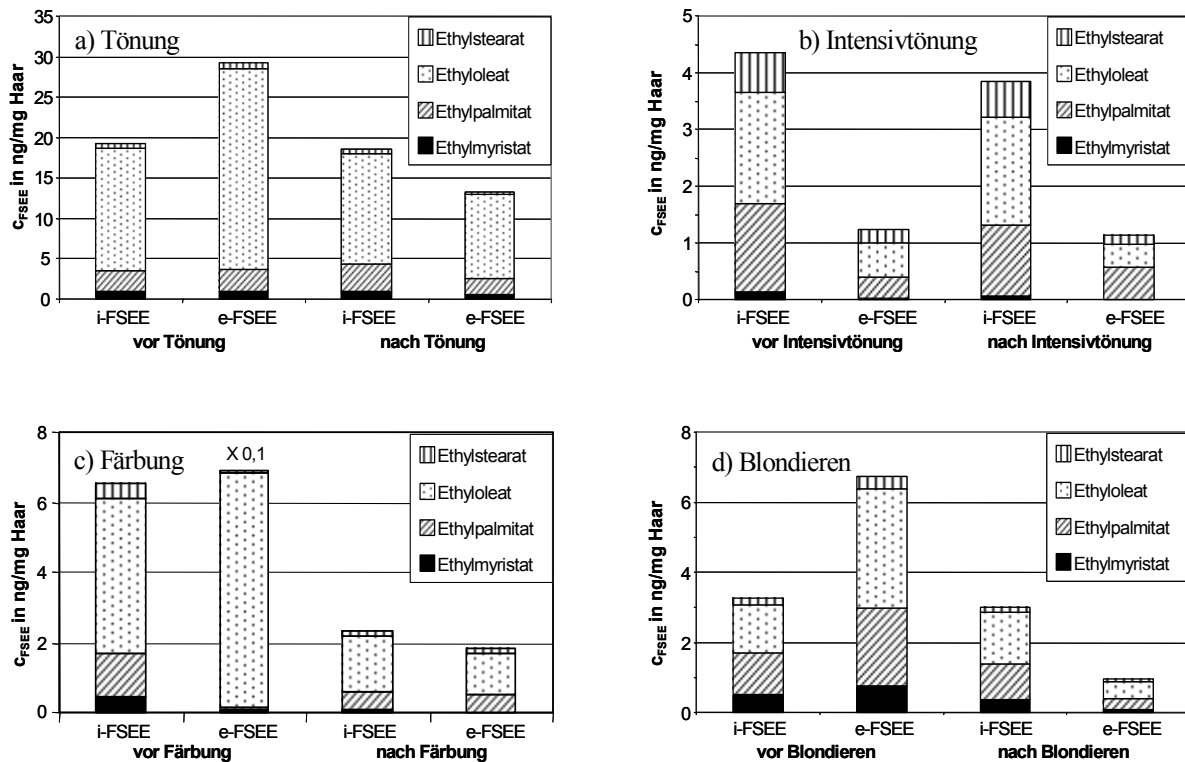


Abb. 33: FSEE-Konzentrationen der Haarextrakte (i-FSEE) und der Waschflüssigkeiten (e-FSEE) bezogen auf die Haareinwaage vor und nach haarkosmetischer Behandlung. Die Behandlungen wurden mit unterschiedlichen Alkoholikerhaarproben durchgeführt.

Ammoniak, der zu einem Aufweichen der Haarstruktur führt. Im Gegensatz zur Tönung können die Reagenzien so ins Innere des Haars gelangen und dort zu oxidativer Zersetzung bzw. Hydrolyse der FSEE führen. Bei der Färbung werden die an der Haaroberfläche haftenden Lipide nahezu vollständig entfernt, wobei für Ethyloleat der oxidative Angriff an der Doppelbindung zu einer zusätzlichen Verminderung der Konzentration führt.

4.3.2.4 Blondieren/Bleichen

Die Haarprobe eines Alkoholikers wurde mit einer Suspension aus einem Blondierpulver (Natriumpersulfat, Ammoniumpersulfat, Magnesiumperoxid, Tenside) und einer 6 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung (pH 11, Einwirkzeit 65 Minuten) behandelt.

Im Haarextrakt zeigte sich gegenüber dem Ausgangswert eine um ca. 8 % geringere Gesamtkonzentration der untersuchten FSEE gegenüber fast 86 % Verlust der FSEE in der Waschflüssigkeit (s. Abb. 33 d, rechts unten). Die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen FSEE zueinander blieben nahezu unverändert. Der Konzentrationsverlust im Haar-

extrakt ist wahrscheinlich auf einen Auswascheffekt zurückzuführen, fällt aber vergleichsweise gering aus.

Bemerkenswert ist, dass offenbar das Quellen des Haars bei Anwesenheit oxidierender Substanzen allein nicht ausreicht, interne FSEE in größerem Umfang herauszulösen oder zu zersetzen. Erst bei zusätzlicher Anwesenheit von Farbstoffen oder anderer in Färbungsmitteln enthaltener Chemikalien ist ein stärkerer konzentrationsreduzierender Effekt festzustellen.

4.3.2.5 Dauerwelle

Die Haarprobe einer Normaltrinkerin wurde einer Haarwäsche mit anschließender Dauerwellbehandlung unterzogen. Das verwendete Wellmittel enthielt Ammoniumthioglykolat, Ammoniumbicarbonat und Ammoniak (pH 9,5). Nach 25 Minuten Einwirkzeit wurden die Haare gespült und mit einer Fixierlösung (Phosphorsäure, Wasserstoffperoxid und einige nichtreaktive Verbindungen, pH 4, Einwirkzeit 15 Minuten) behandelt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 34 graphisch dargestellt. Es fand sich nach der Haarwäsche mit einem handelsüblichen Shampoo eine im Haarextrakt um rund 5 % und in der Waschflüssigkeit eine um rund 81 % verringerte Gesamtkonzentration der vier untersuchten FSEE. Nach der Dauerwellbehandlung war die Gesamtkonzentration um rund 17 % im Haarextrakt und rund 87 % in der Waschflüssigkeit erniedrigt. Während die Konzentra-

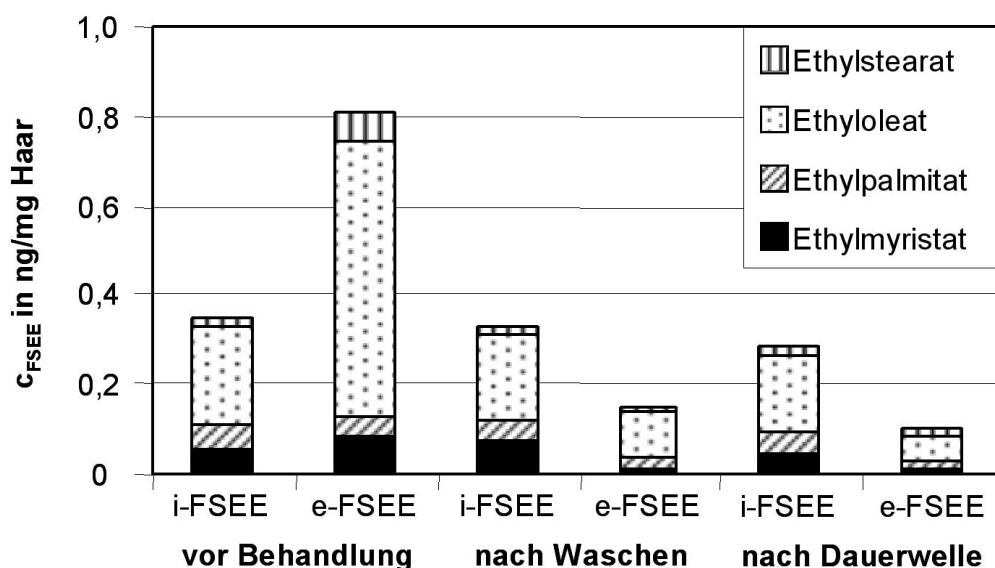


Abb. 34: Vergleich der FSEE-Konzentrationen einer Normaltrinkerprobe im Haarextrakt (i-FSEE) und in den Waschflüssigkeiten (e-FSEE) vor der Behandlung, nach dem Waschen und nach anschließender Dauerwellbehandlung.

tionen der FSEE im Verhältnis zueinander im Haarextrakt nahezu unverändert blieben, zeigte sich für die e-FSEE eine relativ höhere Konzentration von Ethylpalmitat nach der Haarwäsche gegenüber einem verringerten Anteil an Ethyloleat.

Die Dauerwellbehandlung hatte einen etwas stärkeren vermindernenden Effekt auf die FSEE-Konzentration im Haar als die vorangestellte Haarwäsche. Die Kombination von Haarwäsche und anschließender Dauerwellbehandlung führte in der Summe zu einem Verlust von ca. 17 % der FSEE im Haar. Die hohen Verluste in der Waschflüssigkeit sind größtenteils bereits durch die Haarwäsche verursacht worden.

4.3.2.6 Haarwachs

In einigen der untersuchten Proben von Freiwilligen fanden sich in den Waschflüssigkeiten trotz geringer Alkoholaufnahme hohe Konzentrationen an FSEE. So wurde bei der Probe SH 41 im Haar eine Konzentrationssumme von 0,2 ng/mg Haar gefunden, in der Waschflüssigkeit derselben Haarprobe fand sich eine Summe von 3,34 ng/mg Haar (vgl. Abb. 35 a, links oben). Der Proband gab einen Alkoholkonsum von 15-17 g/Tag an. Zur Haarpflege wurde im Fragebogen der Gebrauch von Haarwachs der Marke Murray's® und

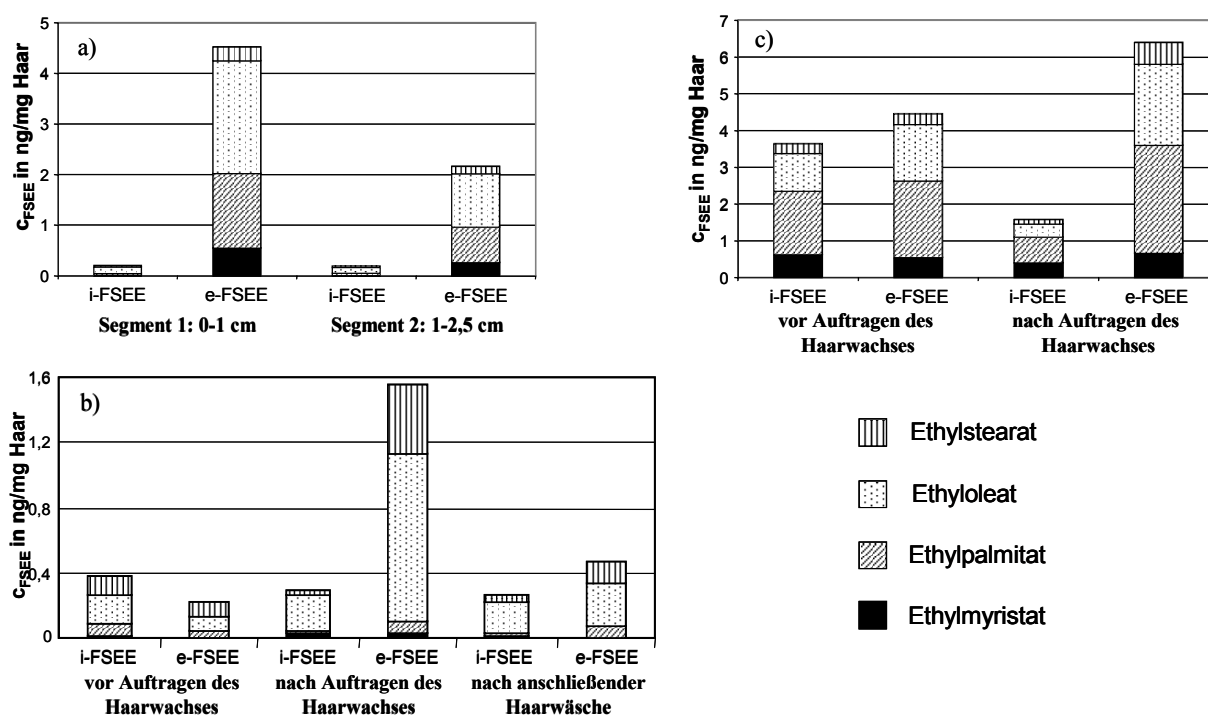


Abb. 35: FSEE-Konzentrationen im Haar und in der Waschflüssigkeit nach Anwendung von Haarwachs
a) bei regelmäßiger Anwendung nach Haarwäsche (2 x wöchentlich). Es wurden zwei Segmente untersucht.
b) bei einmaliger Behandlung einer Abstinenzlerhaarprobe mit anschließender Haarwäsche.
c) bei einmaliger Behandlung einer Alkoholikerhaarprobe.

Haarwäsche mit einer Frequenz von 2-mal pro Woche angegeben. Aufgrund dieses ungewöhnlichen Befundes wurde das verwendete Haarwachs auf seinen Gehalt an FSEE untersucht. Es ergab sich in dem genannten Haarwachs eine Konzentrationssumme der FSEE von 17,6 ng/mg. Als Quelle für die vergleichsweise hohe Konzentration von FSEE in Haarwachsen dient wahrscheinlich das bei der Herstellung verwendete Lanolin, welches bei der Schafwollproduktion beim Waschen der Wolle in großen Mengen anfällt und breite Verwendung in der Herstellung von Kosmetika und Arzneimitteln findet. Dieses auch als Wollwachs bezeichnete Gemisch besteht aus Estern, Di-Estern und Hydroxyestern von aliphatischen Alkoholen und Fettsäuren sowie verschiedenen Sterolen; ca. 0,5 % der Fettsäuren und ca. 12 % der Alkohole liegen im Lanolin unverestert vor [212].

Ethyloleat und Ethylpalmitat waren mit jeweils ca. 45 % Anteil an der Konzentrationssumme dominierend. Ethylmyristat und Ethylstearat waren lediglich zu 3 % und 6 % beteiligt. Diese Verteilung der vier FSEE entspricht in etwa der durchschnittlichen Verteilung in den untersuchten Haarproben. Läge eine andere Verteilung vor, so hätte ein möglicher Eintrag von FSEE aus dem Wachs ins Haar aufgrund der Verschiebungen in den Konzentrationsverhältnissen erkannt werden können. Bei der gefundenen Verteilung hingegen könnte ein solcher Eintrag zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Um zu untersuchen, welche Folgen die Anwendung eines solchen Haarwachses für die FSEE-Konzentrationen im Haar und in den Waschflüssigkeiten hat, wurde daher das Haarwachs nach Anwendungsvorschrift auf die Haarproben einer Abstinenzlerin und eines Alkoholikers aufgetragen. Nach Anwendung des Haarwachses fand sich bei der Abstinenzlerin (vgl. Abb. 35 b, links unten) in der Waschflüssigkeit eine etwa achtfach höhere $c_{\text{e-FSEE}}$ als zuvor. Nach einer Haarwäsche mit einem handelsüblichen Shampoo am folgenden Tag wurde der größte Teil des Wachses wieder entfernt, die $c_{\text{e-FSEE}}$ war nun noch etwa doppelt so hoch wie vor dem Auftragen des Wachses. Viel interessanter verhielten sich die FSEE-Konzentrationen im Haarextrakt. Hier fand sich nach dem Auftragen des Wachses eine um 21 % geringere Konzentration der vier Ester. Eine anschließende Haarwäsche zeigte keinen wesentlichen Effekt mehr auf die Konzentration im Haarextrakt. Offenbar fand eine Diffusion der FSEE aus dem Haar in das sehr lipophile aufgetragene Wachs statt, da die FSEE-Konzentration im Haar von ca. 0,4 ng/mg bezogen auf einen angenommenen Lipidanteil des Haars von 1 % [144], in dem sie gelöst sind, mit ca. 40 ng/mg größer ist als die FSEE-Konzentration im Haarwachs (17,6 ng/mg). Wie groß dieser Effekt bei einer Alkoholikerhaarprobe ist, wurde in einem weiteren Versuch überprüft (vgl. Abb. 35 c,

rechts oben). Neben der erwarteten Zunahme von c_{e-FSEE} in der Waschflüssigkeit nach Auftragen des Haarwaxes und Lagerung der Probe bei Zimmertemperatur über vier Tage zeigte sich im Haarextrakt hier eine noch deutlichere Differenz zum Ausgangsniveau. Der Verlust an $i-FSEE$ nach der Behandlung betrug ca. 57 %.

Es ist danach denkbar, dass ein vormalig im Wertebereich des chronisch exzessiven Alkoholkonsums liegender Proband nach der Anwendung von Haarwachs unter die Grenze von 1 ng/mg sinkt, also ein falsch negatives Ergebnis resultiert. Dabei ist aber zu bedenken, dass die Haarprobe im Versuch mit einer Menge Haarwachs, die weit über der bei kosmetischer Verwendung angewandten lag, benetzt wurde und die so behandelte Probe unbewegt gelagert wurde, wodurch kein natürlicher Verlust der aufgetragenen Haarwachs-schicht durch Abrieb, Witterungseinflüsse oder Haarwäsche stattfinden konnte. Dennoch muss festgehalten werden, dass Haarwachs trotz ihres relativ hohen Eigengehaltes an FSEE besonders in Kombination mit häufiger Haarwäsche einen extrahierenden Effekt auf die Fettsäureethylester im Haar ausüben können.

4.3.2.7 Haarwäsche

Es wurden zwei Versuche mit 40 bzw. 20 Haarwäschen an einer Haarprobe eines Normaltrinkers und eines Alkoholikers unter Verwendung eines handelsüblichen Shampoos (Nivea Hair-Care Glanz Shampoo) durchgeführt. Mit der 15 cm langen und 8 g schweren Haarprobe eines Normaltrinkers wurde täglich eine Haarwäsche durchgeführt (Shampoo-kontakt ca. 30 s) und nach Trocknung bei Raumtemperatur nach jeder 5. Wäsche eine Stichprobe von ca. 70 mg zur Analyse entnommen. Die Bestimmung der FSEE-Konzen-

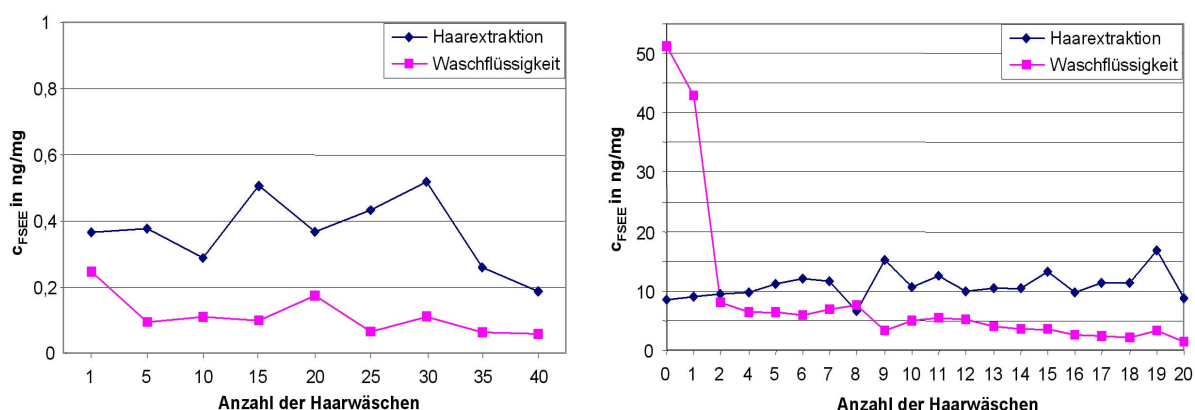


Abb. 36: Konzentrationsverlauf für die FSEE-Konzentrationen im Haarextrakt (c_{i-FSEE}) und in der Waschflüssigkeit (c_{e-FSEE}) für 40 Haarwäschen bei einer Normaltrinkerprobe (links) und für 20 Haarwäschen bei einer Alkoholikerhaarprobe (rechts).

trationen erfolgte nach der in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Methode. Abb. 36 zeigt links den Konzentrationsverlauf der FSEE in Haarextrakt und Waschflüssigkeit für 40 aufeinander folgende Haarwäschen für das Normaltrinkerhaar. In Abb. 36 rechts ist der Konzentrationsverlauf der FSEE für eine Alkoholikerhaarprobe im Verlauf von 20 Haarwäschen dargestellt. Für diese Untersuchung wurde mit der 11 cm langen Haarprobe (4,8 g Gesamtgewicht) eines Todesfalls mit bekanntem exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten täglich eine Haarwäsche durchgeführt, eine Stichprobe entnommen und diese wie die Normaltrinkerprobe auf FSEE analysiert.

Für die Normaltrinkerprobe schwankten die gemessenen c_{i-FSEE} um einen Mittelwert von 0,38 ng/mg Haar. Die Schwankungen resultieren vermutlich aus der Inhomogenität dieser großen Haarprobe, in der sich auch teilweise blondierte Strähnen befanden. Zudem waren die FSEE-Konzentrationen insgesamt sowohl in der Waschflüssigkeit als auch im Haarextrakt eher gering. Eine deutliche Beeinflussung der FSEE-Konzentration in diesem für Normaltrinker typischen Bereich zeigte sich nicht. Im zweiten Versuch wurde die Haarprobe eines Alkoholikers mit sehr hoher FSEE-Konzentration verwendet. Hier zeigte sich in den Waschflüssigkeiten eine deutliche Konzentrationsabnahme von 51,2 ng/mg auf 9,38 ng/mg bereits nach zwei Haarwäschen. Die Folgewerte stabilisierten sich zunächst in einem Bereich um 5 ng/mg, um dann nach etwa 13 Haarwäschen stetig bis auf 1,38 ng/mg nach der zwanzigsten Haarwäsche abzunehmen. Die FSEE-Konzentrationen im Haarextrakt dagegen schwankten nur geringfügig um einen Mittelwert von 10,9 ng/mg. Hier zeigte sich keine ausgeprägte Konzentrationsabnahme. Häufiges Waschen der Haare mit handelsüblichem Shampoo hat demnach keinen relevanten Einfluss auf eine bereits erreichte FSEE-Konzentration im Haar. Durch die ständige Entfernung großer Anteile des äußeren Lipidfilms könnte der Fettsäureethylester eintrag über die äußere Lipidschicht in das Haar jedoch gemindert werden, woraus geringere FSEE-Konzentrationen im Haar resultieren würden. Es ist jedoch anzunehmen, dass dies nur bei sehr häufiger Haarwäsche von Bedeutung ist.

4.3.2.8 Ethanolhaltige Haarkosmetika

Neben der enzymatisch katalysierten Bildung der FSEE aus freien Fettsäuren oder Lipiden und endogenem sowie getrunkenem Ethanol kann eine möglicherweise von Enzymkatalyse unabhängige Bildung von FSEE durch den Kontakt von exogenem Alkohol und Haarlipiden nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Produkte wie Haarwässer und Deodo-

rants, aber auch Haarsprays, Haarfestiger oder anderen Haarkosmetika können Ethanol in größerer Menge enthalten, das bei der Applikation zur Bildung von FSEE führen könnte. In einem ersten Experiment wurde daher die Haarprobe einer Normaltrinkerin für zwei Monate in einer mit Ethanol gesättigten Atmosphäre gelagert. Danach betrug die FSEE-Konzentration im Haarextrakt 16,5 ng/mg gegenüber einem Wert von 0,23 ng/mg vor der Behandlung. Um zu klären, ob bereits die regelmäßige Anwendung ethanolhaltiger Haarkosmetika wie Haarspray, Haarwasser oder Schaumfestiger zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu behandelten drei Normaltrinker während eines Zeitraumes von zwei Monaten täglich die gleiche Kopfhautregion mit Birkenhaarwasser (62,5 Vol.-% Ethanol), während die übrige Kopfhaut unbehandelt blieb. Anschließend wurde aus dem behandelten und dem unbehandelten Bereich jeweils eine Haarprobe entnommen. Bei der Untersuchung auf den Gehalt an FSEE zeigte sich bei allen drei Probanden ein deutlicher Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Seite (vgl. Abb. 37). Bei Proband 1 zeigt sich besonders in den kopfnahen Haarabschnitten eine gegenüber dem unbehandelten Haar deutlich höhere c_{i-FSEE} für die

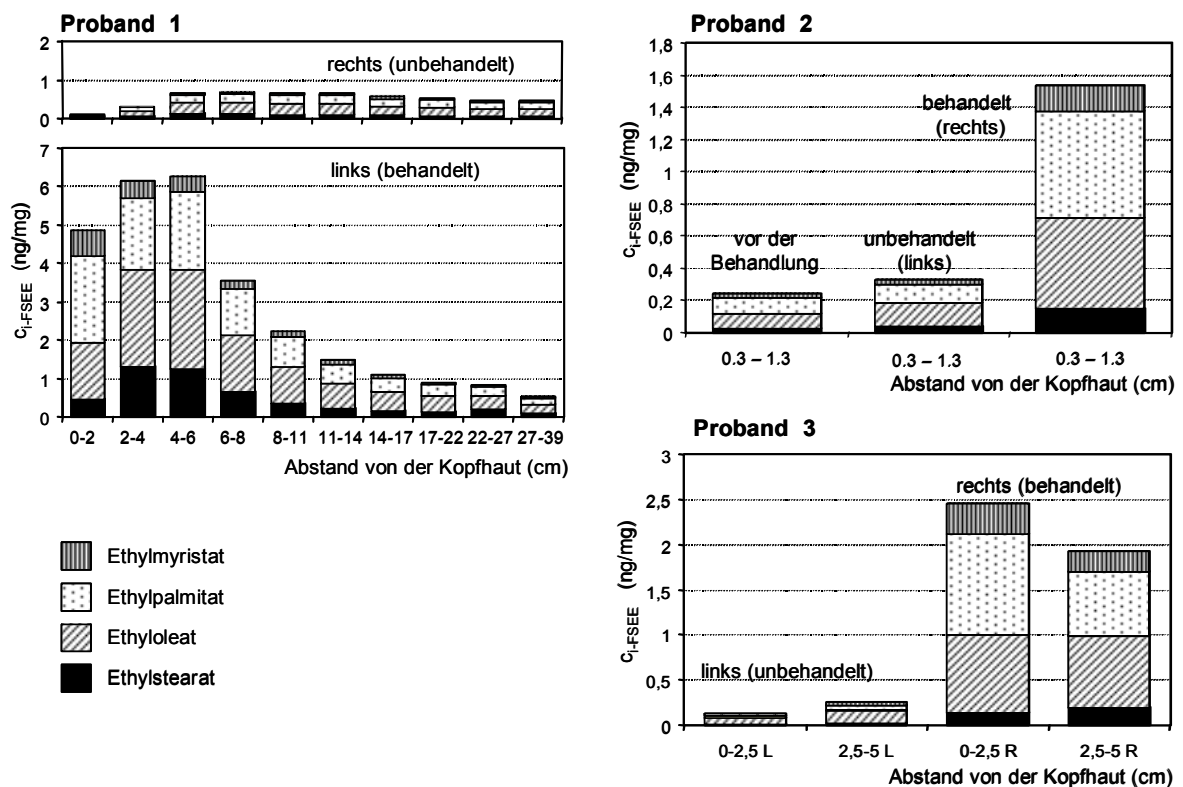


Abb. 37: Vergleich der c_{i-FSEE} im Haar vor und nach zweimonatiger Behandlung einer Kopfhälfte mit ethanolhaltigem Haarwasser bei drei Probanden. Die Haarproben der Probanden 1 und 3 wurden segmentweise untersucht

behandelte Kopfseite. Die Abnahme der c_{i-FSEE} weiter distal lässt sich dadurch erklären, dass das Haarwasser mit den Fingerspitzen in die Kopfhaut einmassiert wurde, somit fand ein direkter Kontakt mit dem Haarwasser hauptsächlich im kopfnahen Bereich statt.

Der tägliche Gebrauch von Deodorant und Haarspray führte bei zwei Probanden zu ungewöhnlich hohen FSEE-Konzentrationen im Haar. Im Fall A (männlich, 23 Jahre alt, durchschnittlicher Alkoholkonsum ca. 4 g Ethanol/Tag), der in Abb. 38 dargestellt ist, benetzte der Proband seine Brustbehaarung täglich mit einem Haarspray. Die c_{i-FSEE} im 1,5 cm langen Haupthaar betrug 0,14 ng/mg, dagegen wurde in den 2 cm langen Brusthaaren eine c_{i-FSEE} von 3,5 ng/mg gemessen. Somit lag die c_{i-FSEE} im Haupthaarextrakt in einem typischen Bereich für Normaltrinker, wohingegen die c_{i-FSEE} im Brusthaar mit deutlich über 1 ng/mg in einem Bereich lag, der üblicherweise bei chronisch exzessivem Alkoholkonsum gefunden wird. Fall B (männlich, 22 Jahre, abstinent) in Abb. 38 zeigt die Ergebnisse für einen Probanden, der täglich Haarspray benutzte. Im Haarextrakt der 6,5 cm langen Haupthaare wurde eine c_{i-FSEE} von 2,1 ng/mg gefunden.

Für die untersuchten Fälle, in denen regelmäßig ethanolhaltige Haarkosmetika zur Anwendung kamen, ergaben sich somit für die FSEE als Marker exzessiven Alkoholkonsums falsch positive Werte. Daraus ergibt sich die Empfehlung, bei Ergebnissen, die im Widerspruch zur angegebenen Trinkmenge stehen, zusätzlich Haarproben aus anderen Körperregionen, in denen keine entsprechende Behandlung stattgefunden hat, zu untersuchen (vgl. Abschnitt 4.3.3).

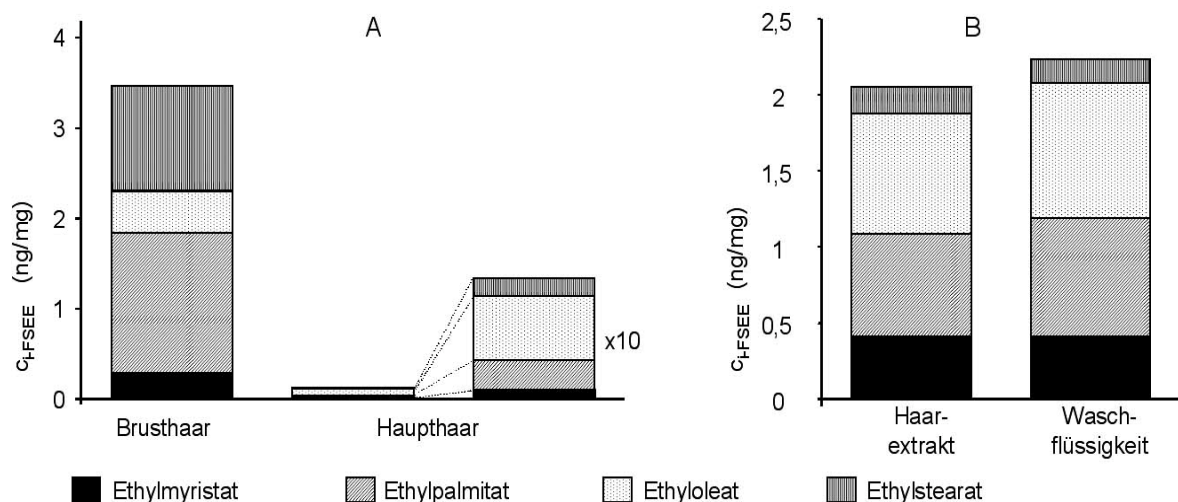


Abb. 38: Einfluss eines ethanolhaltigen Deodorants (A) bzw. Haarsprays (B) auf die FSEE-Konzentrationen im Haarextrakt zweier Probanden. Fall A: Normaltrinker, Brusthaar mit Deodorant behandelt, Haupthaar unbehandelt. Fall B: Abstinenter, das untersuchte Kopfhaar wurde regelmäßig mit Haarspray behandelt.

4.3.2.9 Direkter Eintrag von FSEE aus handelsüblichen Haarpflegeprodukten

Um auszuschließen, dass in Haarpflegeprodukten enthaltene FSEE bei der Anwendung in das Haar gelangen und so zu falsch positiven Ergebnissen führen, wurden über 50 handelsübliche Shampoos, Haarwachse, Tönungsgels, Haarsprays und weitere Haarkosmetika auf ihren Gehalt an den vier FSEE Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat untersucht. In allen Produkten konnten zumindest Spuren dieser FSEE nachgewiesen werden (zwischen 0,13 und 29,6 ng/mg), obwohl sie in keinem der Produkte als Inhaltsstoffe deklariert waren. Die Ergebnisse im Einzelnen wurden in einer Publikation, die sich ausschließlich mit dem Einfluss der Haarkosmetik auf die FSEE-Konzentrationen befasst, veröffentlicht [213].

Eine wesentliche Beeinflussung der c_{i-FSEE} durch die in den Produkten befindlichen FSEE ist bei bestimmungsgemäßer Anwendung für die meisten Produkte unwahrscheinlich. Haarwachse enthielten die höchsten Mengen an FSEE und wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf c_{i-FSEE} und c_{e-FSEE} bereits in Abschnitt 4.3.2.6 beschrieben.

4.3.3 Untersuchung alternativer Haarsorten

Grundsätzlich können Substanzen in sämtlichen Körperhaaren eingelagert werden. In der Vergangenheit wurden zum Zwecke der Haaranalyse neben Haupthaar auch Scham-, Achsel-, Brust- und Barthaar sowie Behaarung der Extremitäten herangezogen. Für illegale Drogen ließ sich hierbei feststellen, dass qualitative Befunde in der Regel bestätigt werden konnten, die quantitativen Ergebnisse aber je nach Substanz und abhängig vom Entnahmeort zum Teil erheblichen Schwankungen unterlagen. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass Körperbehaarung aufgrund der unterschiedlichen Wachstumszyklen andere Zeitbereiche repräsentiert als gleich langes Kopfhaar. Auch Unterschiede in der Produktivität der Schweiß- und Sebumdrüsen können hierzu beitragen. Die Besonderheiten des Haarwachstums sowie mögliche äußere Einflüsse auf die FSEE-Konzentrationen sind für die verschiedenen Haararten in Tabelle 15 zusammengefasst.

Um zu klären, inwieweit auch Haare von alternativen Entnahmeorten für die Prüfung auf FSEE als Alkoholmarker geeignet sind, wurden bei zwei lebenden Normaltrinkern und 22 Sektionsfällen neben Kopfhaar auch Haare von anderen Regionen des Körpers auf FSEE untersucht, darunter Bart-, Achsel-, Brust- und Schamhaare sowie Haare von Armen und Beinen [214]. Bei den Todesfällen lag überwiegend exzessiver Alkoholkonsum vor, was

Tabelle 15: Daten zu Haarwachstum und Besonderheiten menschlicher Haare [213].

Haarart	Wachstumsrate mm / Tag	Zyklusphase* (anag. / kat. + tel.)	Bemerkungen zu möglichen störenden Einflüssen
Kopfhaar	0,37±0,07	2-6 j / 15-20 w	Haarkosmetik und exogene Kontamination.
Schamhaar	0,2-0,3	47-77 w / 51-73 w	Kontakt mit Urin, Kosmetika.
Achselhaar	0,28-0,44	11-18 m / 12-17 m	Hohe Schweißexposition, Deodorants.
Barthaar	0,25-0,27	14-22 m / 9-12 m	Kontamination durch Speisen, alkoholhaltige Getränke.
Augenbrauen	0,15-0,16	6 w / 15 w	Haar- und Gesichtskosmetik.
Körperhaar	0,22-0,32	6-15 w / 8-24 w	Kontamination mit Körperlotionen, Sonnencremes und anderen Kosmetika.
Vellushaar	0,03-0,13	41-63 t / 65-89 t	Wie bei Körperhaar, das Haar ist jedoch sehr dünn und unpigmentiert.

* Dauer der anagenen und der katagenen + telogenen Phase des Haarwachstumszyklus in Jahren (j), Monaten (m), Wochen (w) oder Tagen (t).

sowohl durch die Obduktionsbefunde als auch durch die c_{i-FSEE} -Werte bestätigt wurde.

In Tabelle 16 sind die ermittelten c_{i-FSEE} in den unterschiedlichen Haarsorten zusammengestellt. Das Verhältnis der vier Ester zueinander entsprach in allen Haararten dem bekannten Muster mit hohen Konzentrationen von Ethylpalmitat und Ethyloleat bei wesentlich geringeren Konzentrationen von Ethylmyristat und Ethylstearat. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die verschiedenen Entnahmeorte getrennt behandelt.

4.3.3.1 Schamhaare

Die FSEE-Konzentrationssummen in Schamhaar variierten stark in einem Bereich zwischen 0,14 und 8,5 ng/mg. In Abb. 39 wurden die c_{i-FSEE} im Schamhaar gegen die c_{i-FSEE} im Haupthaar aufgetragen. Es zeigt sich keine klare Korrelation der Konzentrationen. Bei Anwendung des für Haupthaar ermittelten Cut-off-Wertes von 1 ng/mg würden 2 der Fälle (S072/01, S177/01) bei isolierter Betrachtung der Schamhaarprobe falsch negativ bewertet werden. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle führt die Betrachtung der Schamhaarkonzentration aber zu der gleichen qualitativen Zuordnung wie die Betrachtung der Konzentration im Kopfhaar. Die beobachteten Unterschiede beruhen zum einen auf der ungleichen Verteilungsdichte und Größe der Talgdrüsen in Scham- und

Tabelle 16: FSEE-Konzentrationen in Kopf-, Scham-, Achsel-, Bart- und Körperhaaren [214].

Fall-Nr.	Alter, Geschl.	c _{i-FSEE} in ng/mg (Haarlänge in cm)					Trinkgewohnheiten, Todesursache, post mortem BAK
		Kopfhaar	Schamhaar	Achselhaar	Barthaar	Körperhaar*	
SH01	26 w	0,39 (6)	0,33 (4)	---	---	---	Strikt abstinent
SH02	25 m	0,66 (4,5)	0,20 (3)	0,83 (3)	0,34 (0,5)	W: 0,16 (2)	Ca. 1,5 g EtOH/Tag
S341/00	38 m	1,4 (9)	1,5 (5)	---	4,3 (1,5)	---	Alkoholiker, akute Alkoholintoxikation, 3,1 mg/g
S441/00	48 m	4,4 (6)	3,5 (4)	---	11,8 (2)	---	Alkoholiker, Sturz von Leiter, 0,1 mg/g
S063/01	53 m	11,1 (6)	1,4 (4)	---	5,0 (3)	W: 1,8 (2)	Alkoholiker, Verbluten aus Oesophagus- varizen, 1,9 mg/g
S072/01	65 m	2,2 (7)	0,49 (5)	---	1,1 (7)	B: 2,3 (4)	Alkoholiker, Myocard- infarkt, 0,0 mg/g
S083/01	45 m	0,78 (6)	0,52 (4)	---	0,48 (4)	---	Keine Angaben zu Alkoholkonsum, Dro- genabus, 0,4 mg/g
S093/01	31 m	8,2 (12)	5,0 (3)	0,87 (4)	---	---	Ca. 200 g EtOH/Tag, stenosierende Koronar- sklerose und Entzugs- syndrom, 0,0 mg/g
S121/01	36 m	11,7 (6)	3,9 (4)	6,2 (6)	---	---	Alkoholiker, Verbluten aus Oesophagus- varizen, 0,0 mg/g
S139/01	38 m	16,3 (7)	8,5 (5)	---	11,9 (1)	---	Alkoholiker, Pneumonie, 0,0 mg/g
S149/01	24 m	2,8 (6)	3,2 (4)	---	---	---	Alkoholiker, Unfall, 2,9 mg/g
S168/01	29 m	5,7 (6)	2,5 (2)	2,2 (4)	---	---	Alkoholiker, Alkohol- und Drogenintoxi- kation, 2,8 mg/g
S177/01	61 m	2,1 (3)	0,56 (4)	---	6,1 (3)	---	Starker Alkoholabus, Myocardinfarkt, 0,0 mg/g
S210/01	52 m	3,5 (3)	7,7 (4)	---	10,1 (2)	---	Alkoholiker, Erhängen, 2,0 mg/g
S220/01	59 m	0,13 (6)	0,14 (4)	0,11 (4)	0,62 (3)	---	Keine Angaben zu Alkoholkonsum, Lun- genembolie, 0,0 mg/g
S234/01	55 m	9,6 (4)	3,0 (4)	---	6,8 (2,5)	---	Ca. 400 g EtOH/Tag, Herzinsuffizienz, 0,0 mg/g
S235/01	60 w	12,0 (2,5)	13,8 (3)	5,6 (4)	---	---	Alkoholiker, Todesursache ungeklärt, 0,0 mg/g

* W = Wade, B = Brust, A = Augenbrauen.

Fall-Nr.	Alter, Geschl.	c_i-FSEE in ng/mg (Haarlänge in cm)					Trinkgewohnheiten, Todesursache, post mortem BAK
		Kopfhaar	Schamhaar	Achselhaar	Barthaar	Körper- haar*	
S237/01	50 m	1,7 (7)	2,1 (6)	---	---	---	Starker Alkoholabusus, kardiovaskuläre Insuffizienz, 0,0 mg/g
S247/01	58 m	1,3 (10)	3,5 (3)	---	7,5 (2)	---	Ca. 200 g EtOH/Tag, coma diabeticum, 0,0 mg/g
S271/01	49 m	0,11 (3,5)	0,15 (4)	---	---	---	Keine Angaben zu Alkoholkonsum, Tod nach Sepsis, BAK nicht gemessen
S317/01	31 m	1,8 (4)	1,0 (4)	1,6 (3)	1,3 (1,5)	W: 1,3 (2)	Alkoholiker in Entzugsbehandlung, Subduralhämatom nach Sturz, 0,0 mg/g
S484/01	57 m	0,44 (3)	0,43 (5)	---	0,39 (2)	B: 0,31 (4) W: 0,29 (2) A: 0,39 (3)	Ehemaliger Alkoholiker, Lähmung nach Schlaganfall 3 Jahre vor dem Tod, Myocardinfarkt, 0,0 mg/g
S330/02	49 m	11,9 (5)	5,2 (3)	7,9 (4)	17,3 (2)	B: 12,0 (3,5)	Alkoholiker, Todesursache ungeklärt, 1,1 mg/g
S335/02	39 m	3,0 (2,5)	1,7 (4)	---	---	---	Ca. 200 g EtOH/Tag, Verbluten aus Oesophagusvarizen, 0,0 mg/g

* W = Wade, B = Brust, A = Augenbrauen.

Kopfregeion mit deutlicher stärkerer Exkretion auf der behaarten Kopfhaut und zum anderen auf einem unterschiedlichen zeitlichen Ablauf des Haarzyklus (s. Tabelle 15) mit einem relativ hohen Anteil von Schamhaaren in der Telogenphase [215]. Dies bedeutet, dass die Schamhaare einerseits mit weniger Sebum in Kontakt kommen, andererseits aber die Dauer der Sebumexposition länger ist. Weiterhin können Unterschiede in den Gewohnheiten der hygienischen und kosmetischen Behandlung zu der schlechten Korrelation beitragen.

In den meisten untersuchten Fällen zeigte sich eine gegenüber dem Kopfhaar verringerte c_i-FSEE im Schamhaar, was sich in der Steigung der Trendlinie, die deutlich unter 1 liegt, widerspiegelt. Die Untersuchung von Schamhaar allein könnte im Einzelfall bei Anwen-

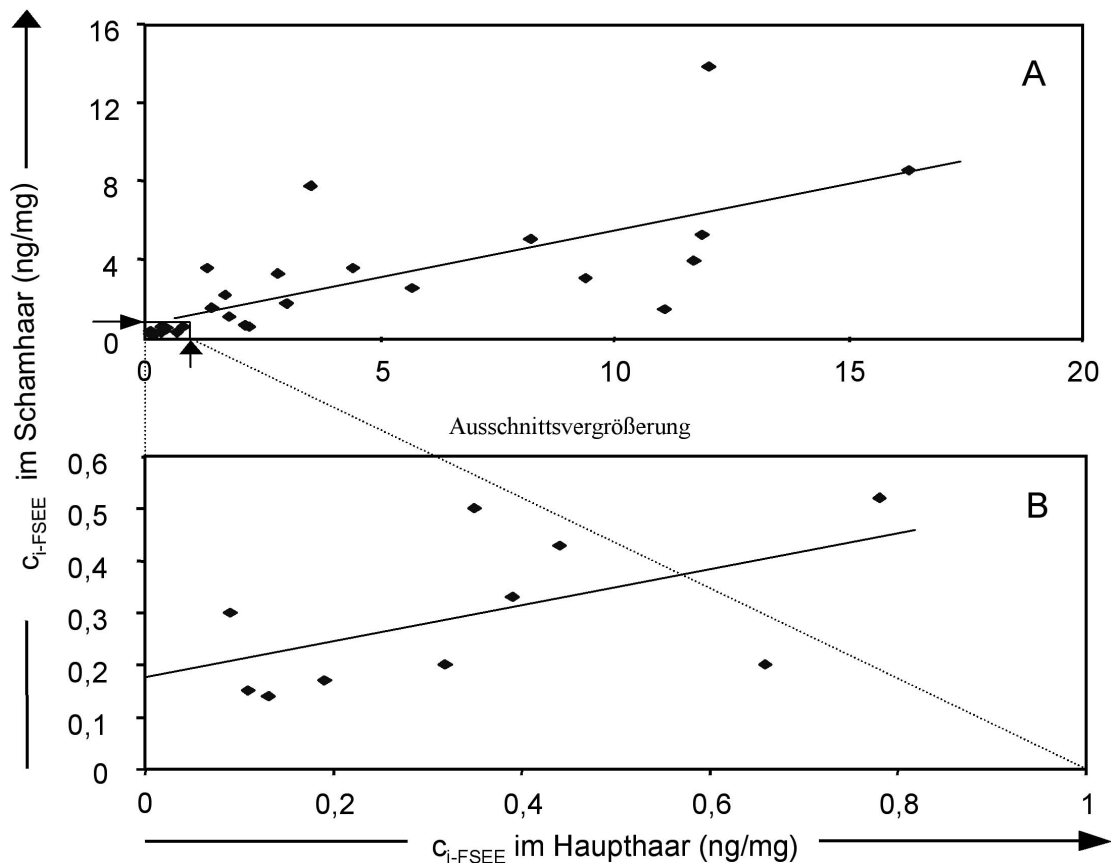


Abb. 39: Vergleich der c_{i-FSEE} für Haupthaar- und Schamhaarproben derselben Probanden mit Trendlinie. Diagramm B stellt eine Ausschnittsvergrößerung von Diagramm A dar.

derung des für Kopfhair festgelegten Cut-off-Wertes daher zu falsch negativen Ergebnissen führen und ist insofern kritisch zu bewerten.

4.3.3.2 Achselhaare

Mit Ausnahme des Probanden SH02, der täglich ein alkoholhaltiges Deodorant angewendet hatte (s. Abschnitt 4.3.2.8), lag die im Achselhaar gefundene c_{i-FSEE} für die acht untersuchten Fälle unter der im Haupthaar gefundenen. Im Fall S093/01 ergab die isolierte Betrachtung der in den Achselhaaren gefundenen c_{i-FSEE} bei Anwendung des Cut-off-Wertes von 1 ng/mg ein falsch negatives Ergebnis. In einem Fall (S317/01) wurde eine im Verhältnis zu den anderen FSEE ungewöhnlich geringe Konzentration von Ethyloleat gefunden.

Für Konzentrationsunterschiede zwischen Achselhaar und Haupthaar können ähnlich wie bei Schamhaar neben unterschiedlichen Wachstumszyklen und Wasch- bzw. Hygienegewohnheiten auch Unterschiede in der Verteilung der Hautdrüsen verantwortlich sein. So

finden sich in der Achselregion nur relativ wenige Talgdrüsen, dafür aber eine Vielzahl apokriner Schweißdrüsen mit einem speziellen Lipidmetabolismus [216].

Die isolierte Betrachtung von FSEE-Konzentrationen in Achselhaaren kann also sowohl zu falsch negativen als auch zu falsch positiven Ergebnissen führen und ist daher ähnlich wie die Analyse von Schamhaar kritisch zu bewerten.

4.3.3.3 Barthaare

In 15 Fällen wurden Barthaare auf ihren Gehalt an FSEE untersucht. Für acht Fälle lag die gemessene c_{i-FSEE} im Barthaar über der c_{i-FSEE} im Haupthaar, für sieben Fälle darunter. Bei den Alkoholikern unter den Sektionsfällen lag die c_{i-FSEE} im Barthaar ausnahmslos über 1 ng/mg Haar. Bei Barthaaren ist ein direkter Kontakt mit alkoholischen Getränken zumindest bei Kinn- und Oberlippenbart als wahrscheinlich anzusehen. Der exogene Alkohol könnte dabei von der Haut absorbiert werden und in den Talgdrüsen oder im bereits sezernierten Haartal zur Bildung von FSEE führen. Ein vergleichbarer Effekt wurde bei der Anwendung ethanolhaltiger Haarlotionen beobachtet (s. Abschnitt 4.3.2.8).

Bei Berücksichtigung einer unteren Grenze für c_{i-FSEE} von 1 ng/mg als Hinweis auf chronisch exzessiven Alkoholmissbrauch ergab sich für alle untersuchten Fälle eine Übereinstimmung in der Zuordnung bei Vergleich mit den korrespondierenden c_{i-FSEE} im Haupthaar. Insofern erscheint Barthaar als geeignetes alternatives Untersuchungsmaterial. Allerdings sollte der möglichen Kontamination durch Alkohol in Getränken Rechnung getragen werden, indem bei Fehlen von Kopfbehaarung Haare einer weiteren Körperregion untersucht werden.

4.3.3.4 Andere Körperbehaarung

Es wurden in sechs Fällen Haare von weiteren Körperregionen untersucht, darunter dreimal Brusthaare, viermal Beinhaare und einmal Augenbrauen. Die Variationsbreite von Länge, Durchmesser und Wachstumszyklus ist bei diesen Körperhaaren am größten. In vier Fällen wies die c_{i-FSEE} in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Analyse des Haupthaars auf chronisch exzessiven Alkoholkonsum hin, allerdings ergaben sich tendenziell kleinere c_{i-FSEE} . Für allgemein gültige Aussagen bezüglich der Verwendbarkeit von Körperbehaarung war die Anzahl der untersuchten Fälle allerdings zu gering. Eine Beeinflussung der FSEE-Konzentrationen im Brusthaar durch ethanolhaltige Deodorants wurde für einen Fall bereits in Abschnitt 4.3.2.8 beschrieben.

Bei der Probennahme ergibt sich für diese Haarsorten häufig das Problem, dass die benötigte Haarmenge nicht oder nur unter ästhetischer Beeinträchtigung des Probanden erhalten werden kann. Daher ist zu empfehlen, in der Praxis zunächst auf die zuvor genannten alternativen Haarsorten zurückzugreifen.

4.3.4 Sebumproduktion und Aufnahmekapazität des Haars

Neben Einflüssen der Haarkosmetik und der Wahl des Entnahmeortes kommen als weitere störende Nebeneffekte individuelle Unterschiede und Schwankungen in der Sebumproduktion und -zusammensetzung in Abhängigkeit von Hauttyp, Lebensalter, Geschlecht, Krankheit und/oder jahreszeitlichen und klimatischen Einflüssen infrage. Auch Unterschiede in der Aufnahmekapazität des Haars für Sebum bzw. FSEE, die durch variierende Haardurchmesser sowie unterschiedliche Durchlässigkeit der Cuticula z. B. infolge haarkosmetischer Behandlung zustande kommen können, stellen ein Problem dar. Die Haarfarbe, die grundsätzlich einen Einfluss auf die Kinetik der Substanzeinlagerung ausüben kann [217], spielt für die FSEE-Konzentrationen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Rolle, da die Einlagerung in erster Linie über das Sebum stattfindet und somit nicht vom Melaningehalt des Haars, der für Unterschiede in den Einlagerungsraten für bestimmte Substanzen verantwortlich ist, beeinflusst ist. Eine systematische und quantitative Untersuchung der genannten Einflüsse war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, zumal Größen wie die Sebumexkretionsrate einer Messung nur schwer zugänglich sind und nur bei lebenden Probanden gemessen werden können.

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass neben dem Trinkverhalten auch andere Größen Einfluss auf die gemessenen FSEE-Konzentrationen nehmen können. Eine Möglichkeit zur Korrektur dieser vielfältigen individuellen Einflüsse stellt die Anwendung von Squalen als natürlicher Bezugssubstanz dar; diese Größe wird im nächsten Abschnitt eingeführt.

4.4 Relative c_{i-FSEE} mit Squalen als natürlicher Bezugssubstanz

Da die FSEE hauptsächlich über das Sebum in das Haar eingelagert werden, kann die von zahlreichen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Jahreszeit etc. abhängige Aktivität der Sebumdrüsen sowie die individuell unterschiedliche Lipid-Aufnahmekapazität des Haars zu Problemen bei der Interpretation der c_{i-FSEE} führen. Zudem findet je nach Häufigkeit und Intensität der Anwendung von Haarkosmetika eine unterschiedlich starke Elimination der

FSEE aus dem Haar statt (s. Abschnitt 4.3.2.1 bis 4.3.2.7). Bei den segmentweise untersuchten Haarproben ergab sich außerdem durch zunehmende Akkumulation der FSEE in der Regel ein Anstieg der Konzentrationen von proximal nach distal (vgl. Abschnitt 4.2.1), was ebenfalls zu Problemen bei der Interpretation der Werte führen kann, insbesondere wenn es nicht möglich ist, das vorzugsweise zur Analyse herangezogene 6 cm lange kopfnähe Haarsegment zu untersuchen.

Als Lösungsansatz für diese Problematik wurde nach einer geeigneten Bezugsgröße gesucht, die als natürlicher Bestandteil des Sebums in möglichst konstantem Verhältnis zum Extraktgewicht anwesend und analytisch gut erfassbar ist. Durch teilen der c_{i-FSEE} durch die Konzentration einer solchen Bezugsgröße, die aus demselben Extrakt bestimmt wurde, erhält man als neue Größe relative FSEE-Konzentrationen, für welche die genannten Effekte zumindest teilweise kompensiert sein sollten. Neben dem auf die Haareinwaage bezogenen Fettsäuregehalt oder dem Cholesteringehalt kommt in diesem Zusammenhang vor allem die Konzentration des Squalens (vgl. Abschnitt 4.1.5) als Bezugsgröße in Betracht, da es in Sebum zu 10 bis 20 Gew.-% enthalten ist und sich durch eine vergleichsweise hohe chemische und biochemische Stabilität auszeichnet. Die Squalenkonzentrationen in menschlichem Sebum schwanken bei Messung unter einheitlichen Bedingungen innerhalb einer akzeptablen Breite. Die unterschiedlichen in der Literatur angegebenen Konzentrationsbereiche ($8,9 \pm 2,9$ % für 26 gesunde Freiwillige [196], $19,9 \pm 6,6$ % für 20 Erwachsene [197], 10-15 % für Aknepatienten [198], 11 % für gepooltes menschliches Sebum [199] bzw. 21-30 % in frisch isolierten Sebumdrüsen [200], 9-13 % für 100 gesunde Freiwillige [202], 13,0-17,5 % für 16 Aknepatienten [218]) sind dabei eher auf methodische Unterschiede bei der Probennahme oder der Analytik zurückzuführen als auf tatsächliche Unterschiede im Squalengehalt des Sebums für die verschiedenen Probandengruppen.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit Squalen als natürliche Bezugssubstanz gewählt, das nach der in Abschnitt 3.4.5 beschriebenen Methode mittels HPLC-DAD bestimmt wurde. In Abb. 40 sind sowohl die FSEE- und die Squalenkonzentrationen als auch die Quotienten c_{i-FSEE}/c_{SQ} aus diesen beiden Größen graphisch dargestellt, die bei segmentweiser Untersuchung der Haarproben eines Alkoholikers und eines Normaltrinkers gefunden wurden. Man erkennt, dass für Squalen ein ähnlicher Konzentrationsverlauf von proximal nach distal erhalten wird, wie für die internen FSEE, allerdings ist das Konzentrationsmaximum für Squalen in Richtung Kopfhaut verschoben. In drei weiteren

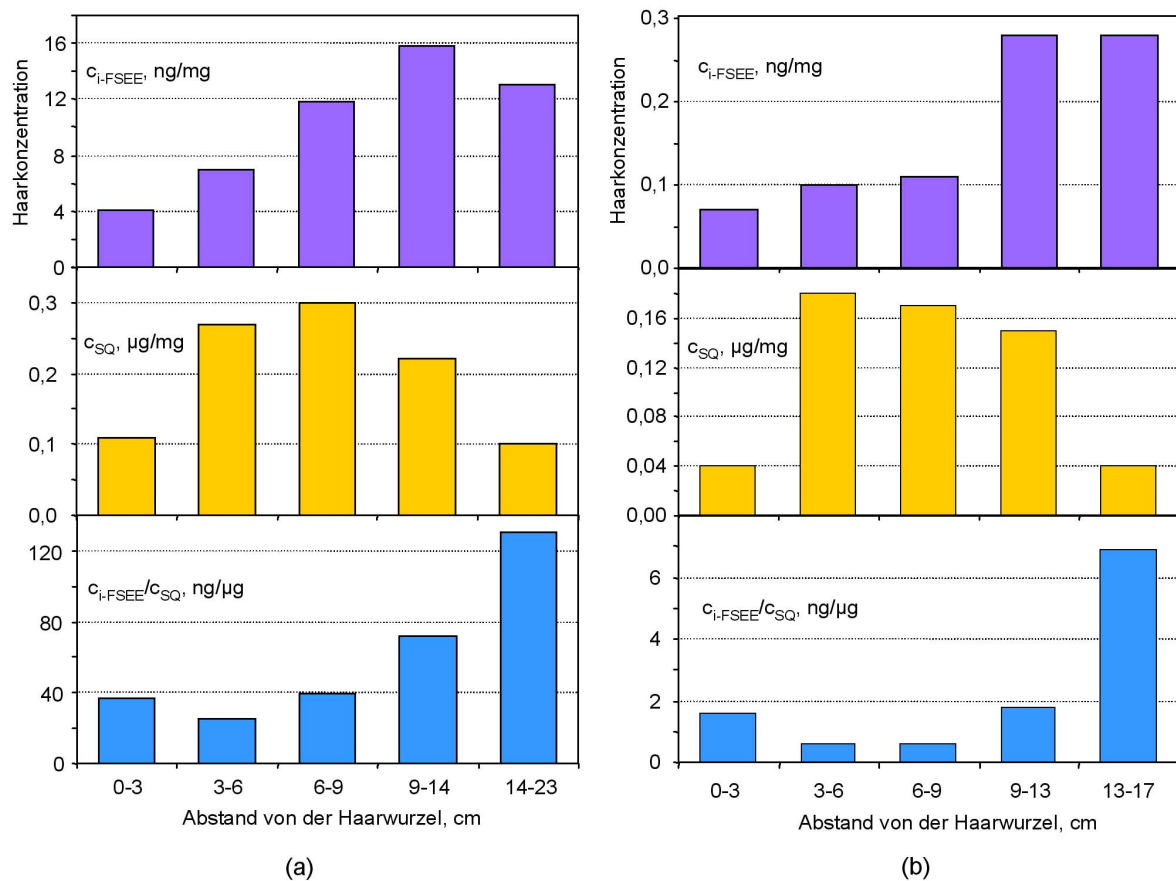


Abb. 40: FSEE-Konzentrationen c_{i-FSEE} , Squalenkonzentrationen c_{SQ} und relative FSEE-Konzentrationen c_{i-FSEE}/c_{SQ} in den Segmenten einer Alkoholikerhaarprobe (a) und einer Normaltrinkerhaarprobe (b).

segmentweise untersuchten Haarproben zeigte sich ein analoger Verlauf. Daraus ist zu schließen, dass das ebenfalls unpolare und wahrscheinlich nach einem ähnlichen Mechanismus ins Haar eingelagerte Squalen (vgl. 4.2.2) aufgrund von Unterschieden in den physikochemischen Eigenschaften eine andere Einlagerungs- und Auswaschkinetik besitzt als die FSEE. Durch Betrachtung des Quotienten c_{i-FSEE}/c_{SQ} werden so die oft zu niedrig ausfallenden FSEE-Konzentrationen der kopfnahen Segmente zwar nach oben korrigiert, insgesamt ergibt sich jedoch über die gesamte Länge keine konstante Größe. Vielmehr findet man im ersten Segment (0-3 cm) und bei längeren Haarproben in den distalen Segmenten ab ca. 10 cm im Vergleich zu c_{i-FSEE} zum Teil deutlich erhöhte Werte. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher nur der proximale Abschnitt von 6 cm Länge herangezogen. Haarproben, die kürzer als 6 cm waren, wurden in voller Länge untersucht. Um genauer aufzuklären, ob der Einfluss der Haarlänge auf die FSEE-Konzentrationen bei Haarproben mit einer Länge unter 6 cm durch Berechnung von c_{i-FSEE}/c_{SQ} kompensiert

werden kann, sind weitere Untersuchungen in kleineren Abschnitten (mit beispielsweise 1 cm Länge) nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, ob durch Heranziehen der auf Squalen bezogenen relativen FSEE-Konzentrationen eine Erhöhung der Aussagesicherheit erreicht werden kann und welche Cut-off-Werte für die neue Größe anzuwenden sind, wurden für Haarproben von 13 Abstinenzlern, 16 Normaltrinkern und 24 Todesfällen mit exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten sowohl c_{i-FSEE} als auch c_{SQ} bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse für 39 weitere Todesfälle, bei denen aus der Vorgeschichte nicht eindeutig zu entnehmen war, ob zu Lebzeiten ein auffälliges Trinkverhalten vorlag. In einigen Fällen bestand jedoch ein Verdacht auf Alkoholismus. Neben den erhobenen Obduktionsbefunden, den Ermittlungsergebnissen der Polizei sowie der postmortalen Blutalkoholkonzentration sollte in diesen Fällen die Bestimmung der FSEE und des Squalens einen weiteren Hinweis erbringen.

Die Squalenkonzentrationen schwankten im gesamten Untersuchungsgut zwischen 0,02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ im Haar zweier Kinder und 1,97 $\mu\text{g}/\text{mg}$ im Haar der Normaltrinkerin N5. Die mittlere Squalenkonzentration betrug ohne Einbeziehung der beiden Kinderhaarproben 0,53 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Es konnte kein deutlicher Unterschied zwischen der mittleren c_{SQ} der erwachsenen Abstinenzler (0,77 $\mu\text{g}/\text{mg}$) und der Normaltrinker (0,75 $\mu\text{g}/\text{mg}$) festgestellt werden. Für die untersuchten Todesfälle hingegen wurden erheblich niedrigere Konzentrationen gefunden, wobei für die als Alkoholiker einzustufenden Todesfälle im Mittel 0,34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ und für die Nichtalkoholiker bzw. Grenzfälle im Mittel 0,54 $\mu\text{g}/\text{mg}$ festgestellt wurden. Diese Unterschiede können teilweise durch die unterschiedliche Altersverteilung mit einem überproportionalen Anteil älterer Personen unter den Todesfällen, andererseits aber durch Effekte des starken Alkoholkonsums auf Stoffwechselfunktionen und somit auch auf die Talgproduktion und -zusammensetzung bedingt sein. In Abb. 41 ist die Verteilung der Squalenkonzentrationen über das Lebensalter für die untersuchten Nichtalkoholiker aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmendem Alter die Squalenkonzentration im Haar tendenziell abnimmt. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass sich die Sebumproduktion in höherem Alter hormonbedingt verringert.

Zur Evaluierung der Daten wurde als Cut-off-Wert zur Unterscheidung von exzessiven Alkoholkonsumenten und Normaltrinkern/Abstinenzlern für den Quotienten c_{i-FSEE}/c_{SQ} ein Wert von 2 $\text{ng}/\mu\text{g}$ gesetzt, der sich aus dem Cut-off-Wert für c_{i-FSEE} von 1 ng/mg

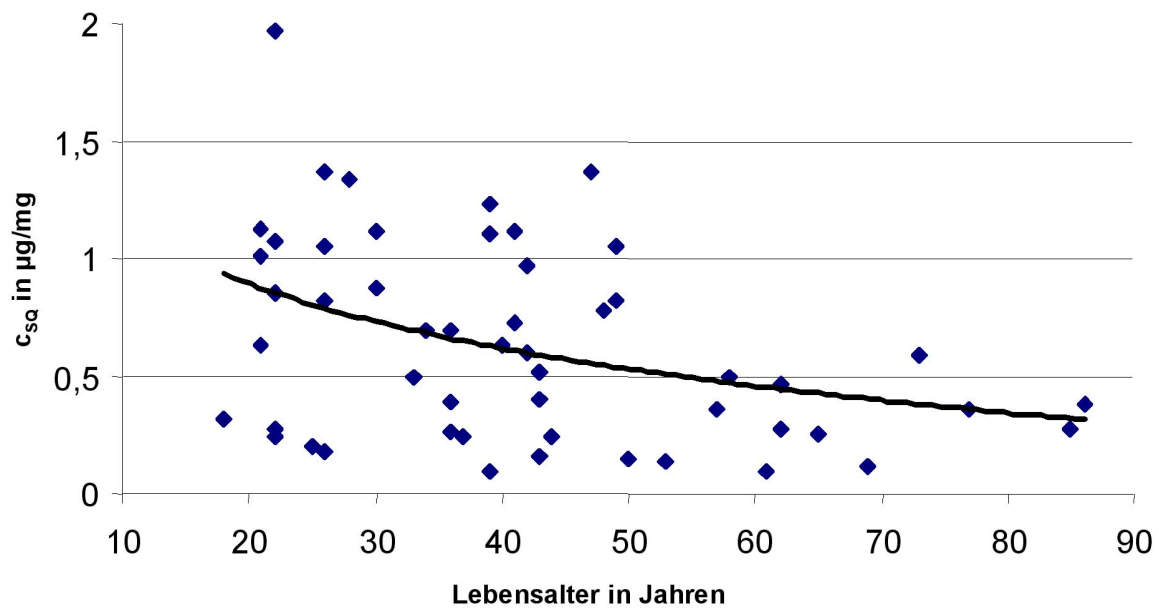


Abb. 41: Altersabhängigkeit der Squalenkonzentration im Haar erwachsener Normaltrinker und Abstinenzler. Es wurden 11 Abstinenzler, 16 Normaltrinker und 25 Todesfälle, die unauffällige FSEE-Konzentrationen zeigten, einbezogen (n = 52). Die Trendlinie ist schwarz eingezeichnet.

(s. Abschnitt 4.3.1) unter Annahme einer durchschnittlichen Squalenkonzentration von 0,5 µg/mg errechnet. Der obere Grenzwert für Abstinenzler verschiebt sich so von 0,4 ng/mg (c_{i-FSEE}) auf 0,8 ng/µg (c_{i-FSEE}/c_{SQ}). Für Kinderhaarproben erscheint eine analoge Modifikation des Cut-off-Wertes von 0,1 ng/mg für c_{i-FSEE} nicht sinnvoll, da offenbar infolge der schwachen Sebumproduktion vor Beginn der Pubertät extrem niedrige Squalenkonzentrationen erhalten werden, die zu einem erhöhten Quotienten c_{i-FSEE}/c_{SQ} führen. Daher werden die Kinderhaarproben aus den folgenden Betrachtungen ausgeschlossen, zumal sich bei Kindern in der Regel die Frage nach chronischem Alkoholmissbrauch nicht stellt.

Abstinenzler- und Normaltrinkerproben (Tabelle 17)

Bezüglich der Werte für c_{i-FSEE} wurden in diesen beiden Gruppen ähnliche Ergebnisse gefunden, wie die in Abschnitt 4.3.1 (Abb. 32) beschrieben. Es gab aber auch einige Abweichungen, auf die hier ein besonderes Augenmerk gerichtet werden soll. In drei Fällen (A12, N11 und N15) gaben die Probanden im Fragebogen an, regelmäßig ethanolhaltige Haarpflegemittel zu benutzen, was die erhöhten Werte für diese Haarproben erklärt (vgl. Abschnitt. 4.3.2.8). Die Fälle A10 und A13 liegen für c_{i-FSEE} zwar mit 0,44 und 0,82 ng/mg über dem Abstinenzlerbereich (< 0,4 ng/mg), zeigen aber für c_{i-FSEE}/c_{SQ} Werte,

Tabelle 17: FSEE-Konzentrationsumme (c_{i-FSEE} , Summe der Konzentrationen von C14-Et, C16-Et, C18 Δ^9 -Et und C18-Et) und Squalenkonzentration c_{SQ} sowie relative FSEE-Konzentrationen (c_{i-FSEE}/c_{SQ}) im Haar von Abstinenzlern, Normaltrinkern und Todesfällen mit exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten.

Fall-Nr.	Alter, Geschlecht	g EtOH/ Woche ^a	Haarlänge gesamt/unter- suchte Länge in cm	c_{i-FSEE} in ng/mg	c_{SQ} in μ g/mg	c_{i-FSEE}/c_{SQ} in ng/ μ g
Abstinenzler						
A1	22, w	0	33/0-6	0,32	1,07	0,30
A2	34, w	0	30/0-6	0,39	0,70	0,56
A3	6, m	0	2/0-2	0,02	0,02	1,33
A4	7, m	0	6/0-6	0,06	0,02	3,31
A5	39, w	0	12/0-6	0,02	0,10	0,24
A6	39, w	0	35/0-6	0,18	1,23	0,15
A7	36, w	0	35/0-6	0,11	0,39	0,28
A8	41, m	0	2,5/0-2,5	0,27	1,12	0,24
A9	40, m	0	5/0-5	0,17	0,63	0,27
A10	41, w	0	21/0-6	0,44	0,73	0,60
A11	43, m	0	6/0-6	0,14	0,40	0,34
A12	48, w	0	10/0-6	1,21 ^b	0,78	1,55 ^b
A13	26, w	0	25/0-6	0,82	1,37	0,60
Normaltrinker						
N1	30, m	41	5/0-5	0,08	1,12	0,07
N2	37, m	54	7/0-6	0,19	0,24	0,79
N3	21, w	18	35/0-6	0,11	1,13	0,10
N4	22, w	27	8/0-6	0,13	0,24	0,54
N5	22, w	18	16/0-6	1,20	1,97	0,61
N6	21, w	142	15/0-6	0,16	1,01	0,16
N7	26, w	63	31/0-6	0,25	0,82	0,30
N8	62, m	54	4/0-4	0,08	0,27	0,30
N9	26, m	36	4/0-4	0,08	0,18	0,46
N10	22, m	43	7/0-6	0,67	0,85	0,79
N11	26, w	52	11/0-6	1,96 ^b	1,05	1,87 ^b
N12	33, m	108	36/0-6	0,32	0,50	0,64
N13	22, m	162	30/0-6	0,29	0,27	1,08
N14	49, w	27	12/0-6	0,87	1,05	0,83
N15	77, w	23	6/0-6	1,38 ^b	0,36	3,83 ^b
N16	30, m	5	20/0-6	0,76	0,87	0,88

Fall-Nr.	Alter, Geschlecht	g EtOH/ Woche ^a	Haarlänge gesamt/unter- suchte Länge in cm	c _{i-FSEE} in ng/mg	c _{SQ} in µg/mg	c _{i-FSEE} /c _{SQ} in ng/µg
Todesfälle mit bekanntem exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten						
329/03	59, w	keine Daten ^c	15/0-6	1,49	0,35	4,27
330/03	60, m	keine Daten ^c	4/0-4	3,90	0,48	8,17
331/03	44, w	keine Daten ^c	16/0-6	2,82	0,27	10,37
339/03	44, w	keine Daten ^c	15/0-6	3,09	0,48	6,41
342/03	56, m	keine Daten ^c	2/0-2	1,31	0,03	48,56
353/03	52, w	keine Daten ^c	11/0-6	1,04	0,28	3,69
360/03	46, m	keine Daten ^c	18/0-6	4,49	0,72	6,27
361/03	22, m	keine Daten ^c	4/0-4	2,35	0,86	2,72
362/03	35, m	keine Daten ^c	2/0-2	9,09	0,17	54,32
365/03	43, m	keine Daten ^c	15/0-6	5,24	1,27	4,14
377/03	41, m	keine Daten ^c	5/0-5	1,64	0,31	5,32
392/03	39, m	keine Daten ^c	2/0-2	2,00	0,24	8,22
494/03	48, w	keine Daten ^c	9/0-9	3,04	0,46	6,60
496/03	60, m	keine Daten ^c	6/0-6	0,38	0,03	11,39
533/03	42, m	keine Daten ^c	6/0-6	6,88	0,31	21,96
284/04	52, m	keine Daten ^c	4/0-4	0,47	0,10	4,68
287/04	53, m	keine Daten ^c	12/0-12	1,74	0,13	13,10
294/04	62, w	keine Daten ^c	20/0-20	0,49	0,08	6,04
374/04	33, m	keine Daten ^c	35/0-6	0,22	0,07	2,99
427/04	59, m	keine Daten ^c	6/0-6	1,04	0,35	3,01
429/04	52, w	keine Daten ^c	17/0-6	3,25	0,46	7,06
439/04	44, m	keine Daten ^c	5/0-5	0,84	0,31	2,72
440/04	41, m	keine Daten ^c	13/0-6	11,21	0,53	20,99
441/04	50, w	keine Daten ^c	20/0-6	2,30	0,34	6,78

^a Angaben der Probanden in einem Fragebogen.

^b Verwendung ethanolhaltiger Haarlotion.

^c Der exzessive Alkoholkonsum ging zweifelsfrei aus den polizeilichen Ermittlungen hervor und wurde durch typische Obduktionsbefunde bestätigt, es waren keine Daten zur täglichen Trinkmenge verfügbar.

Tabelle 18: FSEE-Konzentrationssummen c_{i-FSEE} (C14-Et, C16-Et, C18 Δ^9 -Et und C18-Et) und Squalenkonzentrationen c_{SQ} sowie relative FSEE-Konzentrationen (c_{i-FSEE}/c_{SQ}) im Haar von Todesfällen mit unbekannter Alkoholanamnese.

Fall-Nr.	Alter, Geschlecht	Todesursache und weitere Befunde/Bemerkungen	BAK * in mg/g	Haarlänge gesamt/unter- suchte Länge in cm	c_{i-FSEE} in ng/mg	c_{SQ} in µg/mg	c_{i-FSEE}/c_{SQ} in ng/µg	Auswertung hinsichtlich exzessiven Alkoholkonsums
315/03	28, m	Polytrauma nach Sturz vom Dach eines Hauses	0,9	3/0-3	0,32	1,34	0,24	Negativ
334/03	43, w	Suizid (Amitriptylin- und Metoprololintoxikation), alkoholtypische Schädigungen der Organe	1,7	6/0-6	0,81	0,11	7,73	Grenzwertig
345/03	85, w	Tod im Krankenhaus nach Treppensturz (drei Wochen überlebt)	0,0	40/0-6	0,10	0,27	0,35	Negativ
355/03	37, m	Subdurales Hämatom unklarer Genese, keine Verletzungen. Vermutlich Alkoholmissbrauch (Fettleber, Bauchspeicheldrüse verfestigt)	0,0	5/0-5	1,98	1,90	1,05	Grenzwertig
367/03	60, m	Tod im Krankenhaus (Lungenembolie), alkoholtypische Schädigungen der Leber, der Bauchspeicheldrüse und des Herzen	0,0	7/0-6	0,65	0,13	5,01	Grenzwertig
388/03	62, m	Herzinfarkt	0,0	6/0-6	0,27	0,46	0,60	Negativ
395/03	47, m	Vorerkrankung: Hypophysenadenom, Herztod	0,0	5/0-5	0,57	1,37	0,42	Negativ
398/03	48, m	Polytrauma nach Fenstersturz, Bindegewebsvermehrung der Bauchspeicheldrüse	0,0	5/0-5	1,07	0,83	1,29	Grenzwertig
491/03	57, m	Mischintoxikation (Doxepin, Zolpidem u. Benzodiazepine)	0,3	5/0-5	0,45	0,36	1,24	Negativ
505/03	42, w	Clomethiazolvergiftung, Exalkoholikerin ohne alkoholtypische Organveränderungen	0,0	9/0-9	0,56	0,60	0,94	Negativ
513/03	47, m	Alkoholtoxische Kardiomyopathie, Leberzirrhose	0,2	12/0-12	9,32	0,63	14,76	Positiv
515/03	48, m	Herztod, Leberverfettung und weitere alkoholtypische Organveränderungen	0,0	7/0-7	2,97	1,14	2,61	Positiv

Fortsetzung Tabelle 18

Fall-Nr.	Alter, Geschlecht	Todesursache und weitere Befunde/Bemerkungen	BAK * in mg/g	Haarlänge gesamt/unter- suchte Länge in cm	c_{i-FSEE} in ng/mg	c_{SQ} in µg/mg	c_{i-FSEE}/c_{SQ} in ng/µg	Auswertung hinsichtlich exzessiven Alkoholkonsums
517/03	65, m	Schädelfrakturen mit Hirnprellung nach Kollision mit Auto	0,0	7/0-7	0,10	0,25	0,40	Negativ
518/03	49, m	Krebserkrankung, akute Lungenentzündung, früher Alkoholprobleme. Fettleber, Pankreasgewebe verfestigt, HIV-positiv	0,0	6/0-6	0,83	0,82	1,01	Negativ
522/03	42, m	Schädelfrakturen nach Verkehrsunfall, obdachlos	0,0	14/0-14	0,32	0,97	0,33	Negativ
531/03	20, m	Schädelhirntrauma nach Verkehrsunfall, keine Daten bezüglich Alkoholanamnese, Organspender	0,0	2/0-2	1,39	0,28	5,00	Positiv
537/03	54, m	Suizid (Erhängen), Schmerzpatient	0,0	4/0-4	0,95	0,31	3,05	Grenzwertig
538/03	69, w	Todesursache unklar	0,0	12/0-6	0,15	0,12	1,23	Negativ
084/04	40, m	Stichverletzung, Drogenkonsument mit Fettleber	1,9	5/0-5	1,71	0,10	16,60	Positiv
095/04	36, m	Akute Intoxikation mit Opiaten und Alkohol, beginnende Leberverfettung, Bauchspeicheldrüse verhärtet	2,3	15/0-6	1,06	0,06	18,56	Positiv
100/04	66, m	Verletzungen nach Autounfall (1 Tag überlebt), Leberverfettung und weitere alkoholtypische Organveränderungen, BAK bei Unfall 1,7 mg/g	0,0	8/0-8	0,41	0,07	6,13	Grenzwertig
118/04	39, m	Ertrinken (Badeunfall am See)	2,0	3 /0-3 (Schamhaar)	1,24	0,23	5,34	Positiv
276/04	73, w	Suizid (Polytrauma nach Fenstersturz), bekannter Alkoholabusus, keine alkoholbedingten Organveränderungen feststellbar	0,0	13/0-13	0,20	0,59	0,34	Negativ
277/04	39, w	Suizid (Verbluten nach Messerstichverletzung), Methadonsubstitution, Bauchspeicheldrüse verhärtet	0,6	6/0-6	0,05	1,11	0,04	Negativ

Fortsetzung Tabelle 18

Fall-Nr.	Alter, Geschlecht	Todesursache und weitere Befunde/Bemerkungen	BAK * in mg/g	Haarlänge gesamt/unter- suchte Länge in cm	c _{i-FSEE} in ng/mg	c _{SQ} in µg/mg	c _{i-FSEE} /c _{SQ} in ng/µg	Auswertung hinsichtlich exzessiven Alkoholkonsums
293/04	61, m	Suizid (von Zug überrollt), deutliche Leber- und Bauchspeicheldrüsenverfettung	0,0	8/0-8	0,21	0,05	4,63	Grenzwertig
296/04	25, m	Todesursache unklar	0,1	5/0-5	0,16	0,20	0,80	Negativ
306/04	50, m	Suizid (Erhängen)	0,0	3/0-3	0,03	0,15	0,21	Negativ
309/04	43, m	Todesursache unklar	0,0	6/0-6	0,28	0,16	1,72	Negativ
310/04	21, m	Schädelhirntrauma nach Autounfall	0,0	2/0-2	0,16	0,63	0,26	Negativ
377/04	25, m	Suizid (Sprung aus 4. OG)	1,4	5/0-5	0,53	0,21	2,56	Grenzwertig
379/04	36, m	Todesursache unklar, Exalkoholiker	0,0	6/0-6	0,50	0,69	0,73	Negativ
383/04	36, m	Schädelhirntrauma	0,4	6/0-6	0,13	0,26	0,50	Negativ
389/04	43, m	Suizid (Polytrauma nach Sturz), beginnende Leberverfettung	0,0	4/0-4	0,38	0,52	0,73	Negativ
390/04	44, m	Schädelhirntrauma, früher Alkoholprobleme, laut Ermittlungsakte seit mehreren Monaten abstinent, typische alkoholbedingte Organschädigungen	1,5	3,5/0-3,5	0,44	0,24	1,80	Negativ
398/04	18, w	Suizid (Erhängen), Bauchspeicheldrüse verfettet	0,0	15/0-6	0,31	0,32	0,96	Negativ
406/04	53, w	Multiple Stichverletzungen	0,0	26/0-6	0,25	0,14	1,80	Negativ
408/04	61, m	Schädelhirntrauma nach Sturz (Arbeitsunfall), Bauchspeicheldrüse verfettet	0,0	6/0-6	0,13	0,10	1,28	Negativ
410/04	58, m	Polytrauma nach Sturz vom Dach, Exalkoholiker, leichte Leberverfettung	0,0	5/0-5	0,03	0,50	0,06	Negativ
422/04	86, w	Suizid (Erhängen), polymorbid	0,0	13/0-6	0,27	0,38	0,70	Negativ

* Postmortale Blutalkoholkonzentration

die unterhalb des Grenzwertes von 0,8 ng/μg liegen. Im Fall N5 geht der erhöhte Wert für c_{i-FSEE} mit einer außergewöhnlich hohen c_{SQ} einher, sodass sich für den Quotienten c_{i-FSEE}/c_{SQ} mit 0,61 ng/μg ein im Bereich für Normaltrinker liegender Wert ergibt ($< 0,8$ ng/μg). In diesen drei Fällen führt somit die Betrachtung der relativen FSEE-Konzentrationen zu einer stimmigeren Zuordnung. Für alle anderen Fälle liegen sowohl c_{i-FSEE} - als auch c_{i-FSEE}/c_{SQ} -Werte in den erwarteten Bereichen.

Alkoholikerhaarproben (Tabelle 17)

Für die Mehrzahl der 24 Alkoholikerhaarproben liegen sowohl c_{i-FSEE} als auch c_{i-FSEE}/c_{SQ} in den für Alkoholiker typischen Wertebereichen. Allerdings weisen 5 Proben c_{i-FSEE} -Werte von unter 1 ng/mg auf (Proben 496/03, 284/04, 294/04, 374/04 und 439/04) und zwei liegen nur knapp oberhalb des Cut-off-Wertes (Proben 353/03 und 427/04). Da diese 7 Proben durchweg relativ niedrige c_{SQ} zwischen 0,03 und 0,35 μg/mg zeigen, liegen die relativen FSEE-Konzentrationen mit Werten zwischen 2,72 und 11,39 ng/μg dagegen deutlich oberhalb des Cut-off-Wertes für c_{i-FSEE}/c_{SQ} von 2 ng/μg. Auffällig war, dass alle fünf Fälle mit $c_{i-FSEE} < 1$ ng/mg schwere bis schwerste alkoholbedingte Organschäden aufwiesen (in allen Fällen verfettete Leber und Bauchspeicheldrüse, pathologische Veränderungen des Herzens, 3 Fälle mit Leberzirrhose), die z. T. todesursächlich waren. Bei den übrigen Fällen waren die Organschädigungen meist geringer ausgeprägt oder nicht vorhanden. Für die Personen mit niedrigen Werten für c_{SQ} ist zu folgern, dass eine verminderte Menge an löslichen Lipiden im Haar vorlag. Es ist daher davon auszugehen, dass bei diesen Personen wahrscheinlich durch Veränderungen des Stoffwechsels infolge des chronischen Alkoholmissbrauchs entweder die Sebumproduktion deutlich reduziert war oder die Haarstruktur sich auf eine Art verändert hat, die zu einer niedrigeren Lipid-Aufnahmekapazität führt.

Todesfälle mit unbekannter Alkoholanamnese (Tabelle 18)

Von den 39 untersuchten Fällen aus dieser Gruppe ergaben 25 sowohl hinsichtlich c_{i-FSEE} als auch c_{i-FSEE}/c_{SQ} ein negatives Ergebnis in Bezug auf chronisch exzessiven Alkoholkonsum, wobei sechs dieser Fälle (Proben 505/03, 518/03, 276/04, 379/04, 390/04 und 410/04) in der Vergangenheit zum Teil schwere Alkoholprobleme hatten, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest in den letzten Monaten vor dem Tode abstinent waren. Insgesamt sechs Fälle ergaben für beide Parameter Werte, die über den Cut-offs für chro-

nisch exzessiven Alkoholkonsum liegen. Bei vier dieser Fälle wurden typische Organveränderungen festgestellt, die diesen Befund bestätigten. Ein weiterer Fall (Nr. 118/04) zeigte zwar keine alkoholtypischen Organschäden, war aber bei Todeseintritt stark alkoholisiert. Für den Fall 531/04 besteht die Möglichkeit, dass z. B. durch Verwendung alkoholhaltiger Haarpflegemittel ein falsch positives Ergebnis erzeugt wurde (vgl. Abschnitt 4.3.2.8), da die Organe der zum Todeszeitpunkt 20-jährigen bei einem Verkehrsunfall ums Leben gekommenen Person offenbar gesund waren und zu Transplantationszwecken entnommen wurden. Auch aus dem Umfeld des Betroffenen ergaben sich keine Hinweise auf einen chronisch erhöhten Alkoholkonsum. Bei acht weiteren Fällen, die in der letzten Spalte von Tabelle 18 mit „Grenzwertig“ ausgewertet wurden, ergaben sich bei Betrachtung der beiden Größen unterschiedliche Bewertungen. Im Fall 355/03 wurde ein Wert von 1,98 ng/mg für c_{i-FSEE} gefunden, der in Einklang mit den Organbefunden und dem vermuteten Alkoholmissbrauch steht. Aufgrund des sehr hohen Squalenwertes wird für c_{i-FSEE}/c_{SQ} jedoch nur ein Wert von 1,05 ng/μg erreicht. Möglicherweise war bei dieser Person der Squalengehalt des Sebums aufgrund eines ungewöhnlichen Metabolismus außergewöhnlich hoch. Für den Fall 398/03 ergab sich ein nur knapp über dem Cut-off liegender Wert für c_{i-FSEE} . Eine relativ hohe Squalenkonzentration von 0,83 μg/mg führte auch in diesem Fall zu einem unter 2 ng/μg liegenden Wert für c_{i-FSEE}/c_{SQ} , eine klare Bewertung dieses Falles ist daher nicht möglich. Von den verbleibenden sechs Fällen, für die durchweg hohe Werte für c_{i-FSEE}/c_{SQ} und c_{i-FSEE} -Werte unterhalb des Cut-offs von 1 ng/mg gefunden wurden, waren bei vier Fällen während der Obduktion Organveränderungen feststellbar, die deutlich auf chronischen Alkoholmissbrauch hinwiesen. Als Erklärung kommen die bereits bei den entsprechenden Fällen aus der Alkoholikergruppe beschriebenen Gründe in Betracht. In den zwei Suizidfällen 537/03 und 377/04 waren dagegen keine auffälligen Organbefunde erhoben worden. Im Fall 537/03 lag der Wert für c_{i-FSEE} allerdings nur knapp unter dem Cut-off, es ist daher davon auszugehen, dass in der letzten Zeit vor dem Tode ein erheblicher Alkoholkonsum stattgefunden hatte. Bei Fall 377/04 ist es aufgrund der Datenlage nicht möglich, eine klare Aussage zu treffen.

Die Klärung der Frage, ob die auf Squalen bezogenen FSEE-Konzentrationen im Haar generell eine Verbesserung der Aussagekraft hinsichtlich des Trinkverhaltens ermöglichen, bleibt weiteren Untersuchungen mit einer größeren Zahl an Probanden vorbehalten. Erste Studien hierzu wurden bereits z. T. in Kooperation mit anderen Institutionen durchgeführt

und werden in Abschnitt 4.6 dargestellt. Es erscheint auf Grundlage der hier vorgestellten Betrachtungen sinnvoll, beide Parameter in die Bewertung einfließen zu lassen. Vor allem bei schweren Alkoholikern mit Organschädigungen erwies sich die Einführung der Squalenkonzentration als natürlicher Bezugsgröße als wirksame Korrektur.

Um Aufschluss über das Trinkverhalten in jüngerer Zeit zu erhalten, könnte es von Interesse sein, auch die Waschlösungen von Haarproben auf FSEE und Squalen zu untersuchen, da die Sebumschicht auf dem Haar bei jeder Haarwäsche teilweise entfernt und ständig über die Produktion der Talgdrüsen erneuert wird. Allerdings bietet sich für derartige Fragestellungen eher die Anwendung der in Abschnitt 4.7 beschriebenen Pflaster- und Wischtests an, da die bei dieser Art der Probennahme gewonnenen Lipide neben einem geringen Anteil an Hautlipiden in erster Linie aus Sebum bestehen, aber einige der bei Haarproben potentiell störenden, z. B. durch haarkosmetische Behandlungen hervorgerufenen Effekte entfallen.

4.5 Vergleich von EtG- und FSEE-Konzentrationen im Haar

In einer vergleichenden Studie in Zusammenarbeit mit dem Laboratoire National de Santé, Abteilung Toxicologie (Luxemburg) wurden drei Haarproben von Abstinenzlern, vier von Normaltrinkern (Trinkmenge bis zu 20 g Ethanol/Tag), 10 von Patienten in Entzugsbehandlung nach dokumentiertem chronischem Alkoholmissbrauch und 11 Haarproben von Todesfällen mit exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten auf FSEE und Ethylglucuronid (EtG) untersucht [55]. Die Bestimmung der c_{i-FSEE} wurde nach dem in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zur Analyse auf EtG wurden die Haarproben mit Wasser im Ultraschallbad extrahiert und die erhaltenen Extrakte nach Festphasenextraktion an Aminopropylsäulen und Derivatisierung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid/Pentafluorpropanol (PFPA/PFPOH) mittels GC-MS mit negativer chemischer Ionisierung (NCI) untersucht. Bei einer Nachweisgrenze im Bereich von wenigen pg/mg kann nach bisherigem Stand der Forschung bereits ein positiver EtG-Befund als Hinweis auf das Vorliegen von exzessivem Alkoholkonsum gewertet werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt. Für die drei Abstinenzlerhaarproben wurden mit c_{i-FSEE} -Werten zwischen 0,05 und 0,37 ng/mg Konzentrationen festgestellt, die für diese Gruppe typisch sind. Ethylglucuronid konnte in keiner der drei Proben nachgewiesen werden (LOD 2 pg/mg). Auch im Haar der Normaltrinker konnte kein EtG detektiert werden, c_{i-FSEE} lag für diese Proben zwischen 0,26 und 0,50 ng/mg und somit ebenfalls in

einem typischen Bereich (vgl. Abschnitt 4.3.1). In der Gruppe der Patienten in Entzugsbehandlung konnte in allen Proben Ethylglucuronid nachgewiesen werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 42 und 415 pg/mg. Die c_{i-FSEE} -Werte für diese Gruppe lagen zwischen 0,65 und 20,48 ng/mg, für vier Patienten wurden Werte unter 1 ng/mg erhalten. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Untersuchung der Extrakte auf Squalen (vgl. Abschnitt 4.4) durchgeführt wurde, konnte nicht geklärt werden, ob dieser Befund auf eine durch Stoffwechselveränderungen oder häufige Haarwäsche bedingte Verminderung der Gesamtlipidmenge im Haar zurückzuführen war. Für die Todesfälle wurden durchweg positive EtG-Befunde erhalten (72-3380 pg/mg). Die c_{i-FSEE} -Werte lagen zwischen 1,3 und 30,6 ng/mg und damit ebenfalls alle oberhalb des Cut-off-Wertes von 1 ng/mg.

Bei Vergleich der EtG- und der FSEE-Konzentrationen ergab sich keine klare Korrelation zwischen diesen beiden Größen. Auch die Verteilung der Konzentrationen über die Haarlänge, die bei längeren Haarproben durch segmentweise Untersuchung ermittelt wurde, unterschied sich für die beiden Substanzen deutlich. Während für die FSEE wie auch in

Tabelle 19: Vergleich von FSEE- und EtG-Konzentrationen für Haarproben von Abstinenzlern, Normaltrinkern, Entzugspatienten und Todesfällen mit exzessivem Alkoholkonsum zu Lebzeiten. Die Konzentrationen beziehen sich auf das kopfnähe Segment 0-6 cm.

Proben- bezeichnung	c_{i-FSEE} in ng/mg	c_{EtG} in ng/mg	Proben- bezeichnung	c_{i-FSEE} in ng/mg	c_{EtG} in ng/mg
<i>Abstinenzler</i>			<i>Normaltrinker</i>		
Kinderhaarpool	0,24	n.n.	SH 002	0,26	n.n.
Kind 1	0,37	n.n.	SH 016	0,50	n.n.
SH 031	0,05	n.n.	SH 044	0,50	n.n.
<i>Todesfälle</i>			SH 051	0,37	n.n.
SN 550/01	11,7	0,531	<i>Entzugspatienten</i>		
SN 529/01	30,6	1,774	HV 20	0,69	0,046
SN 562/01	9,8	3,380	HV 21	0,70	0,044
SN 547/01	3,5	0,214	HV 22	0,71	0,304
SN 538/01	10,2	0,327	HV 23	2,15	0,432
SN 530/01	7,3	0,166	HV 24	0,65	0,046
SN 012/02	3,3	0,361	HV 25	3,38	0,140
SN 226/02	13,2	0,255	HV 26	0,86	0,235
SN 063/01	11,1	2,043	HV 27	0,92	0,207
SN 537/01	1,3	0,072	HV 28	20,48	0,042
SN 555/01	1,3	0,887	HV 29	2,83	0,076

n.n.: nicht nachweisbar (LOD = 2 pg/mg).

den vorhergehenden Untersuchungen ein Anstieg von proximal nach distal und das Durchlaufen eines Maximums bei ca. 10-15 cm festgestellt wurde, konnte für EtG in den meisten Fällen eine Verminderung der Konzentrationen von proximal nach distal beobachtet werden (vgl. Abb. 42). Als Erklärung hierfür können die unterschiedlichen Bildungsorte und Einlagerungsmechanismen der Substanzen herangezogen werden. Während FSEE in erster Linie über das Sebum ins Haar gelangen, ist für das hydrophile EtG anzunehmen, dass die Einlagerungswege über den Blutkreislauf und den Schweiß dominieren. Es ist außerdem davon auszugehen, dass EtG bei Haarwäsche und haar-kosmetischer Behandlung leichter ausgewaschen wird als die FSEE.

Des Weiteren konnte weder für FSEE noch für EtG eine klare Korrelation zwischen den Haarkonzentrationen und der Höhe des dokumentierten Alkoholkonsums festgestellt werden. Während dieses Ergebnis für die FSEE aus den in Abschnitt 4.2 dargelegten Gründen zu erwarten war, lässt sich für EtG schließen, dass ein Großteil der Substanz über den Schweiß eingelagert wird, da bei vornehmlicher Einlagerung über den Blutkreislauf der Zeitverlauf des Konsumverhaltens im abschnittsweise untersuchten Haar abgebildet werden müsste.

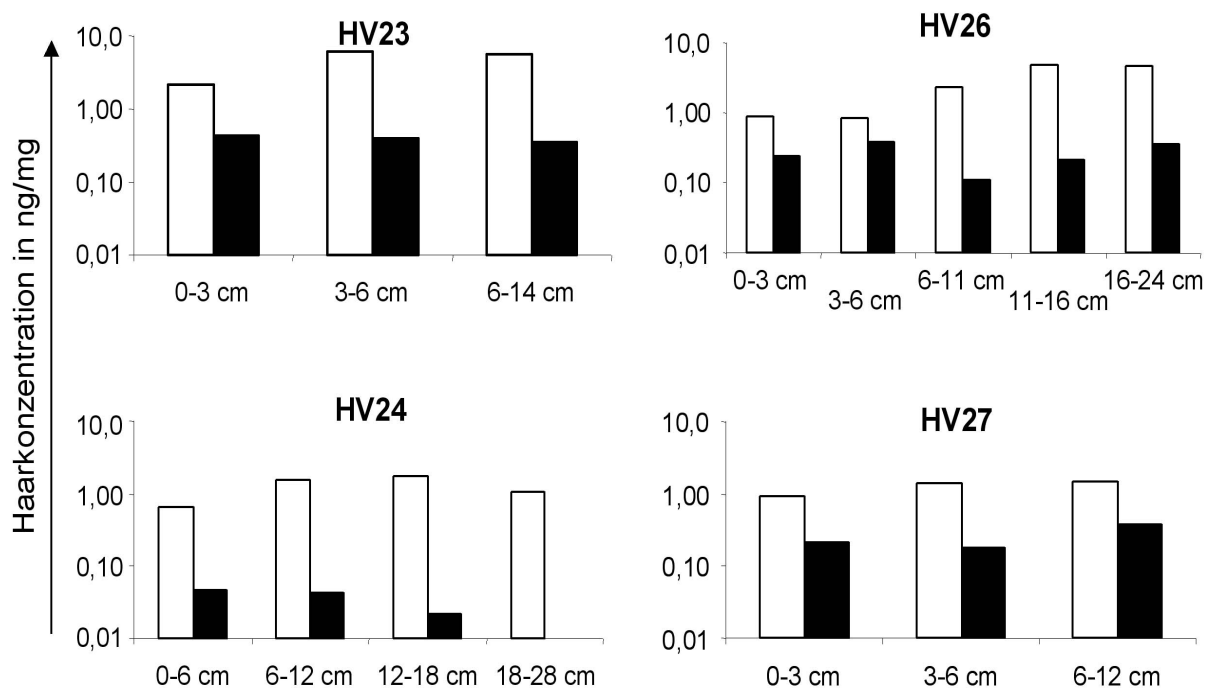


Abb. 42: Segmentweise Analyse auf FSEE (weiße Balken) und EtG (schwarze Balken) bei vier Haarproben von in Alkoholentzugspatienten. Die Histogramme sind in logarithmischer Form dargestellt.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass sowohl FSEE als auch EtG grundsätzlich als qualitative Marker für chronisch erhöhten Alkoholkonsum geeignet sind. Aus beiden ist jedoch aufgrund des Einlagerungsmechanismus keine zeitliche Aussage abzuleiten. Bei Untersuchung auf beide Alkoholmarker lässt sich die Aussagesicherheit in Bezug auf chronisch erhöhten Alkoholkonsum verbessern, da eine gegenseitige Bestätigung erfolgen kann und aufgrund der unterschiedlichen Einlagerungswege eine gleichzeitige negative Beeinflussung beider Parameter durch äußere Störeffekte unwahrscheinlicher wird.

4.6 Erprobung in der Praxis

Nach Abschluss der Vorversuche und Festlegung der Cut-off-Werte für c_{i-FSEE} und c_{i-FSEE}/c_{SQ} wurden FSEE-Bestimmungen im Haar an verschiedenen Probandengruppen durchgeführt. Zum Teil wurden in Kooperation mit anderen Instituten zusätzliche Alkoholmarker wie Ethylglucuronid im Haar oder Phosphatidylethanol, GGT-, CDT- und MCV-Werte aus Vollblut bestimmt und die Ergebnisse mit den FSEE-Befunden verglichen.

4.6.1 Vergleich von c_{i-FSEE} im Haar mit anderen Alkoholmarkern

In Zusammenarbeit mit dem psychiatrischen Universitätskrankenhaus der Universität Basel wurden von 18 Patienten, die zu einer Entgiftungsbehandlung stationär aufgenommen wurden und im letzten Monat vor der Aufnahme zwischen 32 und 253 g (Median 148 g) Ethanol/Tag konsumiert hatten, Haarproben entnommen und auf FSEE untersucht. Parallel wurden mit Phosphatidylethanol, CDT, GGT und MCV vier Alkoholmarker aus dem Blut der Probanden bestimmt. Die Ergebnisse wurden bereits publiziert [219] und sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Die gefundenen Werte für c_{i-FSEE} lagen zwischen 0,39 und 3,19 ng/mg. In sechs der 18 Fälle wurden Werte unterhalb des Cut-offs von 1 ng/mg erhalten, für alle übrigen (66,7 %) lagen die Werte über dem Cut-off. Auch hier wurden keine Squalenkonzentrationen bestimmt und es gelten diesbezüglich die in Abschnitt 4.5 im Zusammenhang mit den dort untersuchten Entzugspatienten gemachten Betrachtungen. Für CDT wurde in 8 von 17 Fällen (47,1 %) Werte erhalten, die oberhalb des üblichen verwendeten Cut-offs liegen. Das MCV war bei nur 7 von 18 Probanden (38,9 %) auffällig erhöht, GGT dagegen bei 13 von 18 Fällen (72,2 %). Bei GGT steht dieser relativ hohen Sensitivität allerdings eine

Tabelle 20: Vergleich der FSEE-Konzentrationen im Haar mit qualitativen Befunden für weitere Alkoholmarker und der von den Patienten angegebenen Trinkmenge bei stationär aufgenommenen Entgiftungspatienten.

Fall-Nr., Geschl.	EtOH-Konsum in g/Tag *	Haarlänge in cm	c _i -FSEE in ng/mg	CDT	MCV	GGT	Phosphatidylethanol
1	243	0-6	2,06	–	–	pos.	pos.
2	187	0-6	3,19	–	–	–	pos.
3	253	0-6	1,71	pos.	pos.	pos.	pos.
4	187	0-5,5	1,69	–	–	pos.	pos.
5	107	0-4	1,22	pos.	–	–	pos.
6	107	0-15	0,73	–	–	–	pos.
7	245	0-4	0,84	–	–	pos.	pos.
8	213	0-6	0,90	–	pos.	pos.	pos.
9	147	0-6	0,39	–	pos.	–	pos.
10	127	0-6	1,07	–	–	pos.	pos.
11	149	0-4,5	1,45	pos.	pos.	pos.	pos.
12	187	0-6	1,91	pos.	–	pos.	pos.
13	37	0-2,5	1,11	n.g.	pos.	pos.	pos.
14	112	0-3,5	1,04	–	pos.	pos.	pos.
15	133	0-5	1,75	pos.	–	pos.	pos.
16	176	0-5	0,53	pos.	pos.	pos.	pos.
17	56	0-3	0,84	pos.	–	pos.	pos.
18	32	0-4,5	1,06	pos.	–	–	pos.

* Durchschnittlicher täglicher Alkoholkonsum im Monat vor der Untersuchung (Patientenangabe).

pos.: oberhalb des Cut-offs; –: unterhalb des Cut-offs; n.g.: nicht gemessen.

Referenzwerte: % CDT < 6 %, MCV < 98 fl, GGT < 20 U/L für Frauen und < 28 U/L für Männer, Phosphatidylethanol < Nachweisgrenze (LOD), c_i-FSEE < 1,0 ng/mg.

geringe Spezifität gegenüber, da erhöhte Leberenzymaktivitäten häufig auf andere pathologische Ursachen als den Alkoholkonsum zurückgehen. Die Analyse auf Phosphatidylethanol schließlich ergab für alle 18 Probanden einen positiven Nachweis. Allerdings ist für diesen Marker nur ein Alkoholkonsum zu erfassen, der nicht länger als ca. 2 Wochen zurückliegt.

Daraus ergibt sich, dass c_i-FSEE als Marker für chronisch exzessiven Alkoholkonsum bei Verwendung eines Cut-off-Wertes von 1 ng/mg im Vergleich mit bisher eingesetzten Alkoholmarkern im Blut hinsichtlich der Sensitivität mindestens genauso gute Ergebnisse liefert. Als besonderer Vorteil der FSEE im Haar ist das im Vergleich zu den anderen

gängigen Markern verlängerte diagnostische Zeitfenster von mehreren Monaten hervorzuheben.

4.6.2 Fahreignungsprüfungen und Gerichtsfälle

Über einen Zeitraum von 4 Jahren wurden 17 Probanden, deren Fahreignung wegen Verdacht auf chronischen Alkoholabusus von behördlicher Seite infrage gestellt wurde, Kopfhaarproben entnommen und diese auf FSEE untersucht. In allen Fällen gaben die Probanden an, in den letzten Monaten strikt abstinenter gewesen zu sein oder nur geringe Mengen Alkohol zu sich genommen zu haben. Diese Behauptung wurde in den meisten Fällen von Seiten eines medizinisch-psychologischen Gutachters bezweifelt, da entweder aufgrund auffälliger Labormarker wie zu hoher GGT- bzw. CDT-Werte oder nach Auswertung der Patientengespräche Hinweise auf einen weiterhin bestehenden Alkoholabusus vorhanden waren. In 10 der 17 Fälle wurden für das 6 cm lange kopfnahe Segment Konzentrationen zwischen 0,10 und 0,36 ng/mg erhalten, die zu der Abstinenzbehauptung für die Monate vor der Probennahme zumindest nicht im Widerspruch stehen. Unter den restlichen 7 Fällen lagen vier Fälle mit c_{i-FSEE} zwischen 0,5 und 0,6 ng/mg im Bereich, wie er üblicherweise bei Normaltrinkern gefunden wird. Drei Fälle lagen mit Werten zwischen 1,0 und 4,0 ng/mg oberhalb des Cut-off-Wertes von 1 ng/mg und somit in einem für chronisch erhöhten Alkoholkonsum typischen Bereich.

Von sechs Fällen, für die im Rahmen staatsanwaltlicher Ermittlungen oder auf Anordnung eines Richters eine Haaranalyse auf FSEE durchgeführt wurde, ergaben sich für 5 Fälle Werte, die im Abstinenzler- bzw. Normaltrinkerbereich liegen (0,14 bis 0,39 ng/mg). Nur in einem Fall bestätigte sich die Behauptung des Betroffenen, dass er starker Trinker sei. In den anderen Fällen, die angaben, regelmäßig große Mengen Alkohol zu trinken, handelte es sich offenbar um Schutzbehauptungen mit dem Zweck, im Strafverfahren aufgrund von eingeschränkter Schuldfähigkeit ein milderer Urteil zu erwirken.

Für 8 dieser insgesamt 23 untersuchten Fälle wurde zusätzlich die Ethylglucuronid-Konzentration im Haar bestimmt. In fünf dieser Fälle stimmte die qualitative Bewertung für beide Parameter überein (ein positiver EtG-Befund kann bereits als Hinweis auf exzessiven Alkoholkonsum gewertet werden, vgl. Abschnitt 4.5). In zwei Fällen, die für FSEE über dem Cut-off lagen, wurde dagegen für EtG ein negatives Ergebnis erhalten (Fall-Nr. 1579/04 und 1584/04). Allerdings lag die Nachweisgrenze der Methode für EtG bei der

Tabelle 21: FSEE- und EtG-Konzentrationen von Haarproben, die im Zuge gerichtlicher Verfahren oder Fahreignungsprüfungen untersucht wurden.

Fall-Nr./ Jahr	Grund der Untersuchung	Untersuchter Haarabschnitt*	c_i-FSEE in ng/mg	c_{EtG} in pg/mg
1132/00	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,32	n.g.
1174/00	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,33	n.g.
1272/00	Fahreignungsprüfung	0-5 cm	0,32	n.g.
1391/00	Fahreignungsprüfung	0-1 cm	0,10	n.g.
0219/01	Fahreignungsprüfung	0-5 cm	0,54	n.g.
0658/01	Trinkbehauptung	0-6 cm	2,53	n.g.
1352/02	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,36	n.g.
1424/02	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,18	n.g.
0783/03	Tötungsdelikt, Trinkbehauptung	0-5 cm	0,16	n.g.
0837/03	Tötungsdelikt, Alkoholikerin?	0-6 cm	0,16	n.g.
1210/03	BtmG-Verstoß	0-6 cm	0,14	n.g.
1392/03	Fahreignungsprüfung	0-3 cm	0,30	n.g.
0145/04	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,12	< LOD
0296/04	Unbekannt	0-6 cm	0,39	n.g.
0338/04	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,23	< LOD
1117/04	Fahreignungsprüfung	0-2,5 cm	0,54	< LOD
1187/04	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,56	n.g.
1395/04	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,53	< LOD
1503/04	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	3,96	138
1579/04	Fahreignungsprüfung	0-6 cm	0,95	< LOD
1584/04	Fahreignungsprüfung	0-5 cm	1,63	< LOD
1676/04	Unbekannt	0-6 cm	0,28	n.g.
1810/04	Fahreignungsprüfung	0-5 cm	0,24	21

* bei segmentweiser Untersuchung längerer Haarproben wurden die Werte aus den Segmentkonzentrationen durch gewichtete Mittelwertbildung berechnet.

n.g.: nicht gemessen, LOD: Nachweisgrenze, lag bei diesen Untersuchungen zwischen 5 und 15 pg/mg.

Bearbeitung dieser beiden Fälle mit 15 pg/mg relativ hoch. Alternativ kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass durch Behandlung mit ethanolhaltigen Haarpflegemitteln ein falsch positiver FSEE-Befund erzeugt wurde. In einem Fall wurde mit 0,24 ng/mg eine relativ niedrige FSEE-Konzentration festgestellt, aber ein positiver EtG-Nachweis erhalten (Fall-Nr. 1810/04). Da zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine Squalenbestimmungen in den Haarextrakten durchgeführt wurden, konnte der sich ergebende Widerspruch in diesem Fall nicht aufgeklärt werden.

In einigen Fällen erwies sich das Verfahren somit als nützliche Hilfe bei der Klärung der Frage, ob chronischer Alkoholabusus vorliegt. Da falsch positive Ergebnisse nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden können, liegt der Hauptbereich der Anwendung für rechtliche Fragen im Ausschluss von exzessivem Alkoholkonsum, der für Führerscheinfragen aber auch für Fragen der Schuldfähigkeit von großer Bedeutung sein kann.

4.6.3 Untersuchung von Haarproben auf Drogen und FSEE

In Zusammenarbeit mit dem National Board of Forensic Medicine, Linköping (Schweden) wurden 193 anonymisierte Haarproben freiwilliger Studenten zunächst auf illegale Betäubungsmittel (Opiate, Amphetamine, Cocain und THC) untersucht. Anschließend wurden von 153 Proben zusätzlich die FSEE- und Squalenkonzentrationen bestimmt, um einen Anhaltspunkt für die Häufigkeit exzessiven Alkoholkonsums in diesem Probandenkollektiv zu erhalten.

Während bei 3 Probanden Cannabiskonsum, bei 8 Konsum von Drogen der Amphetamingruppe, bei 3 Probanden Kokainkonsum und bei 2 weiteren Opiatkonsum nachgewiesen werden konnte, fielen 7 Proben durch erhöhte FSEE-Konzentrationen auf. Dabei gab es keine Überschneidungen der Konsumentengruppen. Dass der Anteil der Probanden mit mutmaßlichem chronischem Alkoholabusus (ca. 4,6 %) im Verhältnis zu den anderen Drogen geringer ist, als es die nationalen Statistiken erwarten lassen, kann zum einen daran liegen, dass die Proben vor der Untersuchung für mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert worden waren (vgl. Abschnitt 4.1.1.2), zum anderen aber auch dadurch zustande gekommen sein, dass im vorliegenden Probandenkollektiv tatsächlich verhältnismäßig wenig Alkoholabusus stattfand. Als dritte Ursache kommt schließlich eine höhere Dunkelziffer bei Drogenkonsum infrage. Die vollständigen Ergebnisse einschließlich einer Auswertung der in einem Fragebogen erhobenen Daten zum Rauschmittelkonsum der Probanden sollen in Kürze publiziert werden.

4.6.4 Vergleich von c_{i-FSEE} und c_{EtG} im Haar mit Blutparametern

Im Rahmen einer in Kanada durchgeführten Studie wurden in Blutproben von Autofahrern, die durch Fahren unter Alkoholeinfluss aufgefallen waren, die Alkoholmarker CDT, Phosphatidylethanol, GGT, MCV, ALAT und ASAT bestimmt. Von bisher 36 dieser Personen wurden zusätzlich Haarproben entnommen und auf FSEE, Squalen und EtG untersucht. Da die Studie noch nicht abgeschlossen ist, soll an dieser Stelle nur auf die

momentan verfügbaren Ergebnisse eingegangen werden. Eine endgültige statistische Auswertung der vollständigen Daten unter Berücksichtigung der anderen gemessenen Laborparameter und der Alkoholanamnese steht noch aus, soll aber in den kommenden Monaten erfolgen und dann publiziert werden.

Die Ergebnisse der Haaranalytik sind in Tabelle 22 dargestellt. Während für Ethylglucuronid in 30 der 36 Haarproben ein positiver Nachweis geführt werden konnte, wurde für die FSEE nur in 18 Fällen Werte festgestellt, die für mindestens einen der beiden FSEE-Parameter oberhalb des Cut-offs für chronischen Alkoholabusus lagen. Drei Fälle mit Werten für c_{i-FSEE}/c_{SQ} im typischen Bereich für exzessiven Alkoholkonsum ($> 2 \text{ ng}/\mu\text{g}$) ergaben einen negativen EtG-Nachweis (Fall Nr. BS090) bzw. einen Wert unter $10 \text{ pg}/\text{mg}$ (Fall Nr. BS001 und BS056). 15 Fälle mit positivem EtG-Nachweis zeigten hingegen für beide FSEE-Parameter Werte unterhalb des Cut-offs. Der erhöhte Anteil der Fälle mit positivem EtG-Nachweis kann zumindest teilweise durch die aufgrund einer verbesserten analytischen Methodik extrem niedrige Nachweisgrenze für EtG bei dieser Untersuchungsreihe (LOD ca. $3 \text{ pg}/\text{mg}$) erklärt werden. Ein weiterer Grund für diese Diskrepanz kann darin gesehen werden, dass sich in dem untersuchten Probandenkollektiv mit hoher Wahrscheinlichkeit ein relativ großer Prozentsatz von Personen befand, die bezüglich ihres Alkoholkonsums im Grenzbereich zwischen Normaltrinkern und Alkoholikern lagen. Auch die Tatsache, dass in 14 der 36 Fälle die Werte für c_{i-FSEE} und c_{i-FSEE}/c_{SQ} bei Verwendung der Cut-offs von $1 \text{ ng}/\text{mg}$ bzw. $2 \text{ ng}/\mu\text{g}$ unterschiedliche Aussagen bezüglich der Auswertung hinsichtlich exzessiven Alkoholkonsums ergaben, kann auf diesen Umstand zurückgeführt werden.

Eine vorläufige statistische Auswertung von 18 Proben, für die bereits alle Alkoholmarker gemessen und ausgewertet wurden, ist in Tabelle 23 dargestellt. Ein Korrelationskoeffizient von 1 bzw. -1 zeigt einen perfekten linearen Zusammenhang zweier Größen mit positiver bzw. negativer Geradensteigung an, ein Wert von 0 bedeutet, dass die beiden Größen nicht miteinander korrelieren. Werte $> 0,5$ bzw. $< -0,5$ zeigen eine starke Korrelation an. Es ergab sich eine deutliche Korrelation zwischen den relativen FSEE-Konzentrationen im Haar (c_{i-FSEE}/c_{SQ}) und den Werten für Phosphatidylethanol im Blut (Pearson-Korrelation nach Normalisierung der Verteilungen: $r = 0,62$). Die c_{i-FSEE} hingegen korrelierten positiv mit den Werten für ALAT bzw. ASAT im Blut ($r = 0,52$ bzw. $0,75$). Die Ethylglucuronid-Haarkonzentrationen schließlich zeigten eine starke Korrelation mit den GGT-Werten ($r = 0,59$).

Tabelle 22: FSEE-Konzentrationen (c_{i-FSEE}), relative FSEE- und EtG-Konzentrationen (c_{i-FSEE}/c_{SQ} und c_{EtG}) in Haarproben kanadischer Kfz-Führer, die alkoholisiert im Straßenverkehr aufgefallen waren. Werte für FSEE bzw. relative FSEE oberhalb des Cut-off-Wertes sind blau dargestellt.

Fall-Nr.	Untersuchter Haarabschnitt *	c_{i-FSEE} in ng/mg	c_{i-FSEE}/c_{SQ} in ng/ μ g	c_{EtG} in pg/mg
BS001	0-3 cm	0,22	4,82	< 10
BS005	0-4 cm	0,59	0,41	62,7
BS023	0-6 cm	0,90	0,98	78,9
BS026	0-6 cm	0,21	0,45	11,3
BS051	0-5 cm	0,31	2,24	151,7
BS052	0-8 cm	0,86	0,65	43,3
BS053	0-6 cm	0,42	3,26	30,4
BS054	0-6 cm	1,00	1,53	240,5
BS056	0-6 cm	0,16	2,38	< 10
BS058	0-7 cm	0,46	0,42	24,4
BS060	0-6 cm	0,77	0,69	31,7
BS061	0-3 cm	0,78	1,16	79,28
BS062	0-6 cm	0,08	0,23	19,5
BS064	0-4 cm	0,21	1,49	25,1
BS067	0-5 cm	0,30	1,27	29,2
BS069	0-4 cm	0,40	3,78	164,7
BS070	0-5 cm	1,00	0,67	18,1
BS071	0-4 cm	0,52	0,80	97,4
BS086	0-6 cm	0,27	0,29	22
BS088	0-6 cm	0,22	2,87	11,9
BS090	0-6 cm	0,26	4,43	n.n
BS091	0-6,5 cm	0,86	0,50	41,9
BS092	0-7 cm	5,79	4,72	105,5
BS094	0-6,5 cm	2,56	1,37	71,4
BS096	0-7 cm	0,37	0,48	89,2
BS098	0-5 cm	3,05	1,09	64,3
BS099	0-4 cm	0,36	1,80	< 10
BS100	0-6 cm	0,21	0,16	< 10
BS101	0-7 cm	0,35	0,45	n.n.
BS105	0-4 cm	2,39	1,79	24,1
BS112	0-6 cm	0,92	0,66	48,2
BS116	0-5 cm	5,20	2,10	48,3
BS123	0-6 cm	1,73	1,35	15,5
BS124	0-6 cm	1,15	1,22	328,6
BS128	0-6 cm	2,91	13,81	11,3
BS131	0-6 cm	2,05	3,77	79,2

* bei segmentweiser Untersuchung längerer Haarproben wurden die Werte aus den Segmentkonzentrationen durch gewichtete Mittelwertbildung berechnet.

n.n.: nicht nachweisbar (< LOD = 3 pg/mg).

Tabelle 23: Pearson-Korrelation zwischen allen gemessenen Größen und den 3 im Haar gemessenen Parametern c_{i-FSEE} , c_{i-FSEE}/c_{SQ} und c_{EtG} . Die Verteilung der Werte für Phosphatidylethanol, GGT, c_{i-FSEE} , c_{i-FSEE}/c_{SQ} und c_{EtG} wurden vor der statistischen Analyse normalisiert, indem zu den Werten 1 addiert und die Wurzel aus dem Ergebnis gezogen wurde ($n = 18$).

	c_{i-FSEE}	c_{i-FSEE}/c_{SQ}	c_{EtG}
CDT	0,24	0,35	-0,25
Phosphatidylethanol	0,14	0,62	-0,11
GGT	0,10	0,38	0,59
MCV	0,04	0,11	0,26
ALAT	0,52	0,22	0,26
ASAT	0,75	0,25	0,24
c_{i-FSEE}	1,00	0,13	0,15
c_{i-FSEE}/c_{SQ}		1,00	0,005
c_{EtG}			1,00

Einschränkend ist zu bemerken, dass mit der bisher in die statistische Untersuchung einbezogenen Anzahl von Probanden ($n = 18$) keine zuverlässigen Schlüsse gezogen werden können und daher abzuwarten bleibt, ob sich die oben angegebenen Zusammenhänge bei Einbeziehung einer größeren Anzahl von Probanden bestätigen.

Abschließend ist aus den bisherigen Erfahrungen in der Praxis zu schließen, dass FSEE im Haar, insbesondere wenn sie auf die Squalenkonzentration im Haar bezogen werden, eine gute Alternative bzw. Ergänzung zu den bisher aus Blut bestimmten Langzeitmarkern für chronischen Alkoholabusus darstellen. Im Grenzbereich zwischen Alkoholikern und stärkeren Normaltrinkern bestehen jedoch weiterhin Probleme. Durch zusätzliche Bestimmung von Ethylglucuronid im Haar, das über einen anderen Einlagerungsmechanismus ins Haar gelangt als die FSEE (vgl. Abschnitt 4.5), kann die Aussagesicherheit bei chronischem Alkoholabusus weiter erhöht und das Auftreten falsch negativer Ergebnisse minimiert werden. Vor allem in Fällen, bei denen die Betrachtung eines isoliert erhöhten Alkoholmarkers mit geringer Spezifität (beispielsweise GGT) zu einer Benachteiligung führen kann (z. B. Fahreignungsprüfung oder Abstinenzkontrolle während einer Entzugsbehandlung), aber auch bei der Klärung der Frage, ob bei Todesfällen zu Lebzeiten chronisch exzessiver Alkoholmissbrauch vorlag (vgl. Tabelle 18 in Abschnitt 4.4), kann die Analytik auf FSEE im Haar wertvolle Hinweise liefern.

4.7 Relative FSEE-Konzentrationen in Hautoberflächenlipiden

Da die Einlagerung über das Sebum den Haupteinlagerungsweg der FSEE ins Haar darstellt (vgl. Abschnitt 4.2), wurde untersucht, ob auch in den Oberflächenlipiden der Haut, die in erster Linie aus Sebum bestehen, FSEE nachzuweisen sind und ob diese ebenfalls als Alkoholmarker herangezogen werden können. Die Physiologie der Sebumproduktion wurde bereits in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Aus den Keratinozyten der Epidermis freigesetzte Lipide, die sich in ihrer Zusammensetzung vom Sebum unterscheiden, haben nur in Körperregionen mit geringer Sebumdrüsendichte einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtzusammensetzung der Hautoberflächenlipide. Daher wurden zur Probennahme ausschließlich Körperregionen mit hoher Sebumdrüsendichte wie Stirn, Gesichtshaut, Schulter- bzw. Rückenpartie oder die Hautflächen der äußeren Oberarme ausgewählt.

Für die Probennahme wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: das Abwischen der Hautoberfläche mit einem geeigneten, zuvor mit einem Lösungsmittel benetzten Wattestäbchen (Wischtest) und das Anbringen eines Pflasters auf der Haut, das für eine bestimmte Dauer getragen wird (Pflastertest).

Da bei einer solchen Art der Probennahme die Absolutmenge der abgewischten bzw. vom Pflaster aufgenommenen Lipide von Fall zu Fall stark differieren kann und einer Wägung schlecht zugänglich ist, wurde als interne Bezugssubstanz zusätzlich Squalen bestimmt. Durch Teilen der Absolutmenge der im abgewischten bzw. vom Pflaster aufgenommenen FSEE (m_{FSEE} in ng) durch die Absolutmenge des enthaltenen Squalens (m_{SQ} in μg) erhält man die relative FSEE-Konzentration $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ (in ng/ μg). Diese Größe stellt eine gute Vergleichsbasis dar, weil der Squalengehalt von Sebum unter gleichen Probennahme- und Messbedingungen nur innerhalb einer geringen Bandbreite schwankt (vgl. Abschnitt 4.4).

4.7.1 Wischtest auf FSEE

Zunächst wurden 29 Freiwillige in einem Fragebogen zu ihrem Trinkverhalten in den 7 Tagen vor der Probennahme und zu ihrem durchschnittlichen wöchentlichen Alkoholkonsum in den letzten Monaten befragt. Am Tag vor der Probennahme wurden die Probanden aufgefordert, an der Stirn keine Cremes, Make-up oder andere Kosmetika aufzubringen. Nach dem in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Verfahren wurde dann jeweils an der rechten und an der linken Seite der Stirn der Wischtest durchgeführt, separat nach der in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels HS-SPME/GC-MS

auf FSEE (Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethylstearat und Ethyloleat) und mit HPLC-DAD auf Squalen untersucht. Weiterhin wurden von 15 Todesfällen, die im Institut für Rechtsmedizin der Charité obduziert wurden, auf dieselbe Weise Wischproben abgenommen. Zehn dieser Fälle waren als Alkoholiker bekannt und wiesen bei der Obduktion typische alkoholbedingte Organschädigungen auf. Für sechs dieser Fälle wurde zusätzlich eine Haaranalyse auf FSEE durchgeführt, die in allen Fällen den starken Alkoholabusus bestätigte. Fünf weitere Todesfälle, die keine klaren Anzeichen eines Alkoholmissbrauchs zeigten, wurden zu Vergleichszwecken untersucht. In Abb. 43 ist jeweils ein typisches Chromatogramm für die Bestimmung der FSEE (a) und des Squalens (b) in einer Wischprobe des Alkoholikers mit der Fall-Nr. 383/03 dargestellt.

Die Squalenmengen, die in den Proben gefunden wurden, variierten stark im Bereich zwischen 6 und 295 μg . Die niedrigsten Mengen wurden in den Proben zweier Kinder gefunden (6 und 13 μg), die generell weniger Sebum produzieren als Erwachsene [220]. Die durchschnittliche Squalenmenge für die Proben der Todesfälle lag mit 130 μg deutlich über der Durchschnittsmenge, die bei den Normaltrinkern (70 μg) und den Abstinenzlern (42 μg) gefunden wurde. Diese große Variationsbreite verdeutlicht die Notwendigkeit der Einführung eines natürlichen internen Standards wie des Squalens, auf das die FSEE-Werte bezogen wurden.

In Tabelle 24 sind die Werte für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ mit den über einen Fragebogen erfassten Trinkmengen für die Normaltrinker und die Abstinenzler angegeben. Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse für die Todesfälle unter Angabe der Todesursache und der postmortalen Blutalkoholkonzentration. In beiden Tabellen sind auch die auf Squalen bezogenen Haarkonzentrationen $c_{\text{i-FSEE}}/c_{\text{SQ}}$ angegeben, sofern sie gemessen wurden. Abgesehen von zwei Fällen (N10 und 367/03) ergab sich für die Proben von linker und rechter Stirnseite eine relativ gute Übereinstimmung der Werte (durchschnittliche Standardabweichung 16 %). Die auftretenden Schwankungen sind durch ungleichmäßige Verteilung des Sebums und durch teilweise Entfernung der Hautlipidschicht z. B. während des Schlafs durch Reibung an der Bettwäsche zu erklären. In Abb. 44 sind getrennt nach den Gruppen die Werte für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ der Abstinenzler (0,16-1,12 $\text{ng}/\mu\text{g}$, Mittelwert 0,34 ng/mg), der Normaltrinker (0,08-0,94 $\text{ng}/\mu\text{g}$, Mittelwert 0,37 $\text{ng}/\mu\text{g}$) und der Alkoholiker (2,4-24,2 $\text{ng}/\mu\text{g}$, Mittelwert 13,1 $\text{ng}/\mu\text{g}$) graphisch dargestellt.

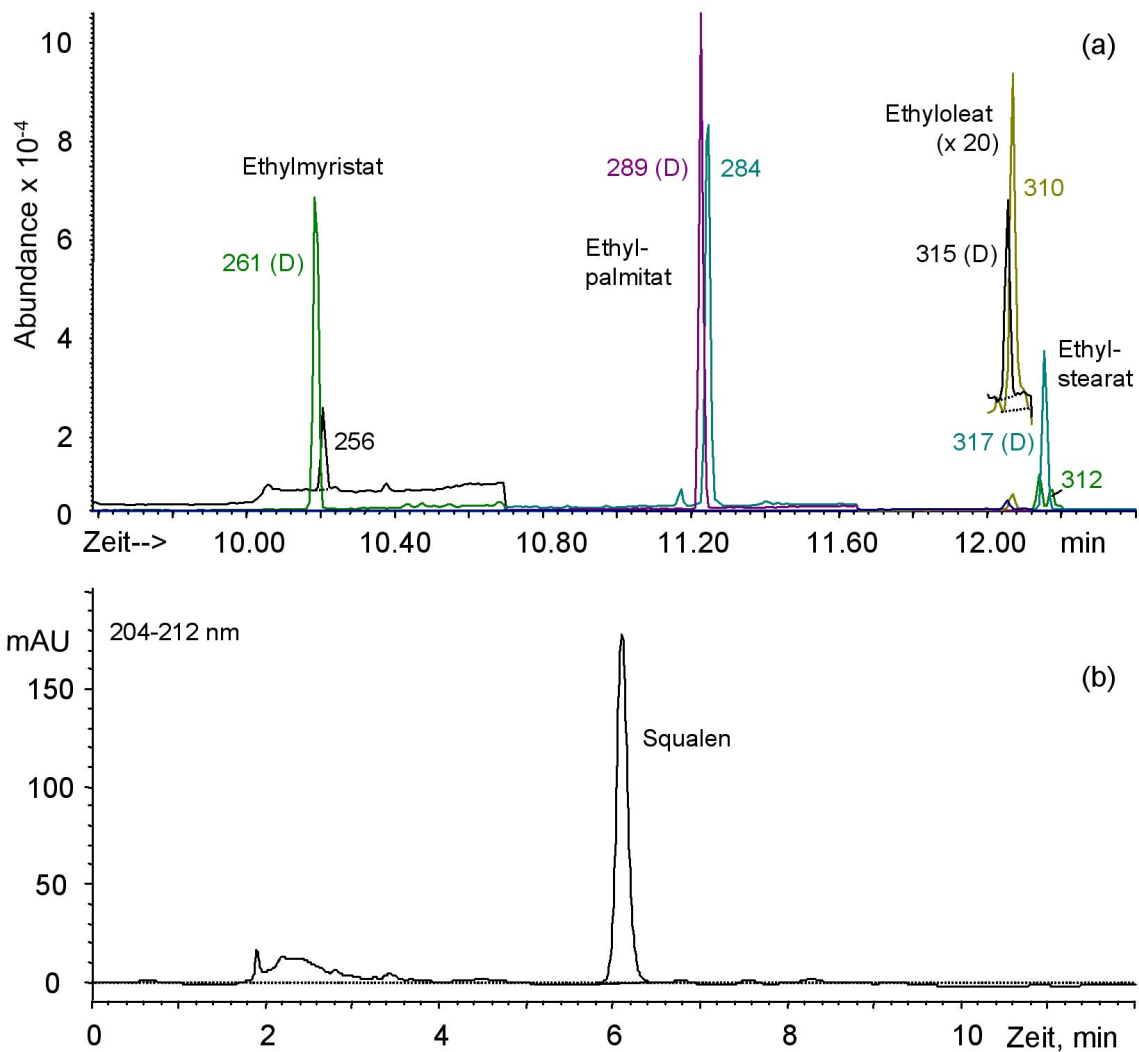


Abb. 43: Chromatogramme, die bei Messung der Hautoberflächenlipidprobe eines Alkoholikers (Fall-Nr. 383/03) erhalten wurden. (a) zeigt die Ionenspuren der GC-MS-SIM-Analyse auf FSEE. Die Signale für die deuterierten Verbindungen sind mit „(D)“ gekennzeichnet, es sind nur die Massenspuren der Molekülionen dargestellt. (b) zeigt das bei der Squalenbestimmung erhaltene HPLC-DAD-Chromatogramm. Die Probe enthielt 15 ng Ethylmyristat, 74 ng Ethylpalmitat, 43 ng Ethyloleat, 12 ng Ethylstearat und 27 µg Squalen, $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}} = 5,36 \text{ ng}/\mu\text{g}$.

Dass auch in den Hautlipiden von Abstinenzlern geringe FSEE-Konzentrationen zu finden sind, korrespondiert mit den Befunden in Haarproben von Abstinenzlern (vgl. Abschnitt 4.3.1), in denen ebenfalls geringe Konzentrationen an FSEE gefunden wurden. In der Gruppe der Normaltrinker konnte keine Korrelation zwischen den Werten für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ und der Trinkmenge in der Woche vor Probennahme oder der durchschnittlichen Trinkmenge in den letzten Monaten vor der Probennahme gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass der Beitrag zu $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ durch die relativ geringen Mengen konsumierten Alkohols in dieser Gruppe im Vergleich mit der Abstinenzlergruppe nicht zu einer signifi-

Tabelle 24: Relative FSEE-Konzentrationen m_{FSEE}/m_{SQ} in Hautoberflächenlipiden mit Squalen als natürlicher Bezugssubstanz, die mittels Wischtest bei Abstinenzlern und Normaltrinkern erhalten wurden im Vergleich mit den Haarkonzentrationen c_{i-FSEE}/c_{SQ} .

Fall-Nr.	Alter, Geschl.	g EtOH in der letzten Woche	g EtOH pro Woche, Ø ^{a)}	m _{FSEE} /m _{SQ} in ng/µg			c _{i-FSEE} /c _{SQ} im Haar in ng/µg
				Probe 1	Probe 2	Mittelwert	
Abstinenzler							
A1	22, w	0	0	0,16	0,15	0,16	0,30
A2	34, w	0	0	0,12	0,21	0,17	0,56
A3	6, m	0	0	0,28	0,25	0,26	1,33
A4	7, m	0	0	0,29	0,40	0,34	3,31
A5	39, w	0	0	0,12	0,20	0,16	0,24
A6	39, w	0	0	0,22	0,55	0,39	0,15
A7	36, w	0	0	0,13	0,19	0,16	0,28
A8	41, m	0	0	0,15	0,25	0,20	0,24
A9	40, m	0	0	0,14	0,14	0,14	0,27
A10	41, w	0	0	1,17	1,06	1,12	0,60
A11	43, m	0	0	0,33	0,35	0,34	0,34
A12	48, w	0	0	0,77	0,77	0,77	1,55 ^{b)}
A13	26, w	0	0	0,27	0,24	0,25	0,60
Normaltrinker							
N1	30, m	36	41	0,14	0,16	0,15	0,07
N2	37, m	72	54	0,08	0,08	0,08	0,79
N3	21, w	63	18	0,18	0,14	0,16	0,10
N4	22, w	45	27	0,44	0,47	0,45	0,54
N5	22, w	45	18	0,05	0,04	0,05	0,61
N6	21, w	171	142	1,15	0,75	0,95	0,16
N7	26, w	63	63	0,16	0,17	0,17	0,30
N8	62, m	72	54	0,49	0,39	0,44	0,30
N9	26, m	72	36	0,31	0,18	0,25	0,46
N10	22, m	108	43	1,56	0,35	0,95	0,79
N11	26, w	153	52	0,18	0,13	0,15	1,87 ^{b)}
N12	33, m	144	108	0,23	0,50	0,37	0,64
N13	22, m	261	162	0,14	0,15	0,14	1,08
N14	49, w	9	27	0,41	0,47	0,44	0,83
N15	77, w	18	23	0,70	0,70	0,70	3,83 ^{b)}
N16	30, m	14	5	0,42	0,40	0,41	0,88

^{a)} Durchschnittlicher wöchentlicher Alkoholkonsum in den Monaten vor der Probennahme (Angabe der Probanden).

^{b)} Verwendung ethanolhaltiger Haarlotion.

Tabelle 25: Relative FSEE-Konzentrationen m_{FSEE}/m_{SQ} in Hautoberflächenlipiden, die mittels Wischtest bei einigen Todesfällen erhalten wurden im Vergleich mit den Haarkonzentrationen c_{i-FSEE}/c_{SQ} .

Fall-Nr.	Alter, Geschl.	BAK ^{a)} in ‰	m _{FSEE} /m _{SQ} in ng/µg			c _{i-FSEE} /c _{SQ} ^{b)} im Haar in ng/µg	Todesursache, Bemerkungen
			Probe 1	Probe 2	Mittelwert		
Alkoholiker ^{c)}							
339/03	44, w	0,4	2,72	2,04	2,38	6,41	Magenblutung
342/03	56, m	2,4	10,64	9,72	10,18	48,56	Herzinfarkt
362/03	35, m	3,1	22,57	23,58	23,08	52,32	Dekompensierte Leberzirrhose, 0,7 l Schnaps/Tag
367/03	60, m	0,0	6,42	0,88	3,65	5,01	Lungenembolie, überlebte 12 h im Krankenhaus
377/03	41, m	2,6	25,12	23,55	24,33	5,32	Ertrinken
383/03	45, m	0,5	5,36	4,64	5,00	n. b.	Lungenentzündung, dekompensierte Leberzirrhose
392/03	39, m	0,0	0,10	0,06	0,08	8,22	Herzinfarkt, Entzugspatient
414/03	38, m	2,1	7,71	4,57	6,14	n. b.	Chronische Pankreatitis, Alkoholintoxikation
417/03	38, m	1,9	22,38	18,28	20,33	n. b.	Subdurales Hämatom nach körperlicher Gewalt
427/03	57, m	0,0	11,02	9,61	10,32	n. b.	Lungenentzündung, überlebte 8 h im Krankenhaus; 1,4 ‰ bei Einlieferung
Todesfälle ohne klaren Hinweis auf Alkoholmissbrauch							
355/03	37, m	0,0	1,42	1,39	1,40	1,05	Subdurales Hämatom
388/03	62, m	0,0	0,08	0,12	0,10	0,60	Herzinfarkt
395/03	47, m	0,0	0,90	0,92	0,91	0,42	Hypophysenadenom
398/03	48, m	0,0	0,80	0,94	0,87	1,29	Sprung aus dem Fenster
413/03	63, m	0,0	0,62	0,44	0,53	n. b.	Peritonitis nach Darmperforation

^{a)} Postmortale Blutalkoholkonzentration.

^{b)} Für chronisch exzessiven Alkoholabusus wurde ein Cut-off von 2 ng/µg vorgeschlagen (vgl. Kap. 4.4).

^{c)} Suchtmäßiger Alkoholkonsum war aus der Vorgeschichte bekannt und wurde durch typische Organbefunde bei der Obduktion bestätigt.

n. b. = nicht bestimmt.

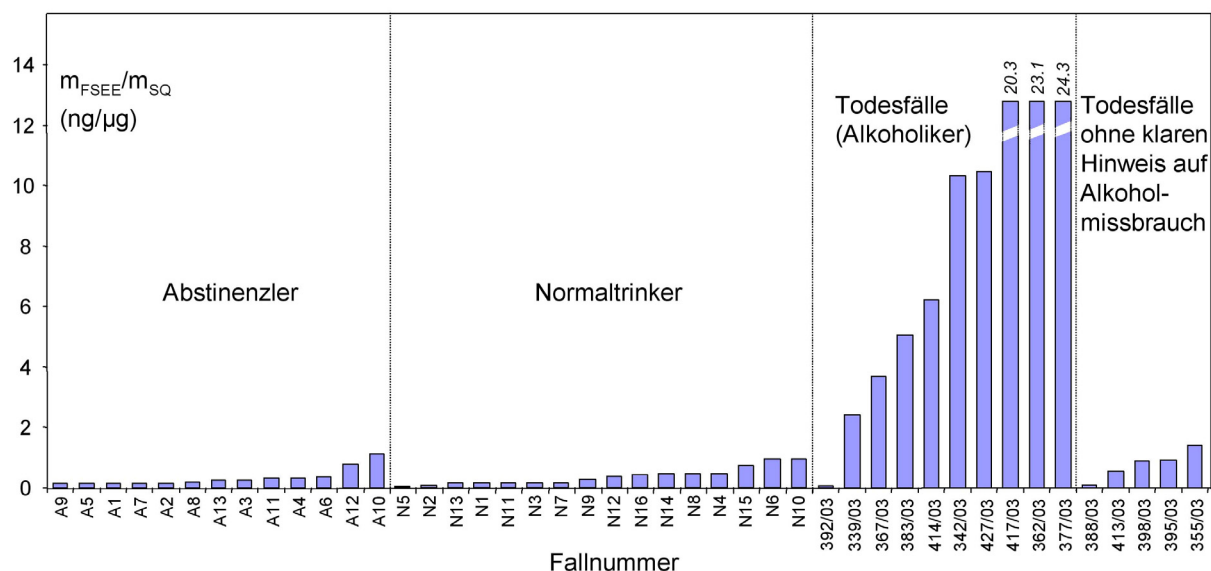


Abb. 44: Relative FSEE-Konzentrationen $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ in mittels Wischtest gewonnenen Hautoberflächenlipiden von Abstinentzern, Normaltrinkern sowie von Todesfällen mit bekanntem chronischem Alkoholabusus und Todesfällen ohne klaren Hinweis auf Alkoholmissbrauch.

kanten Veränderung der Werte ausreichen. Ein weiterer Grund für die fehlende Korrelation kann in der relativ langen Zeit, die zwischen Bildung und Erscheinen der FSEE an der Hautoberfläche vergeht (ca. 8 Tage, vgl. Abschnitt 2.2.3), gesehen werden, wodurch es zu Fluktuationen in Abhängigkeit von der Trinkdynamik kommen kann.

Die Werte, die in der Gruppe der zehn Alkoholiker gefunden wurden, lagen im Mittel mehr als eine Größenordnung über den in den anderen beiden Gruppen gefundenen. Sieben dieser Fälle wiesen postmortale Blutalkoholkonzentrationen zwischen 0,4 und 3,1 mg/g auf. Zwei der Alkoholiker (Fall-Nr. 367/03 und 427/03) mit postmortaler BAK von 0,0 mg/g hatten einen lebensbedrohlichen Zustand für 12 bzw. 8 Stunden im Krankenhaus überlebt. Der Zeitpunkt der letzten Alkoholaufnahme ist unbekannt, er sollte aber vor dem Zeitpunkt der Einlieferung gelegen haben. Trotzdem wurden noch ähnlich hohe Werte für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ gefunden wie bei den anderen Alkoholikern. Der dritte Fall mit postmortaler BAK von 0,0 mg/g (392/03) befand sich in einer Entzugsbehandlung und starb im Krankenhaus an den Folgen eines Herzinfarktes, nachdem er mindestens 12 Tage abstinent geblieben war. Während im Haar noch hohe FSEE-Konzentrationen festgestellt wurden, lagen die in den Hautoberflächenlipiden gemessenen Werte für diesen Fall bereits im Bereich der Normaltrinker und Abstinentzler. Die fünf Todesfälle, die zu Vergleichszwecken untersucht wurden, zeigten sowohl im Haar als auch in den Hautlipiden Werte,

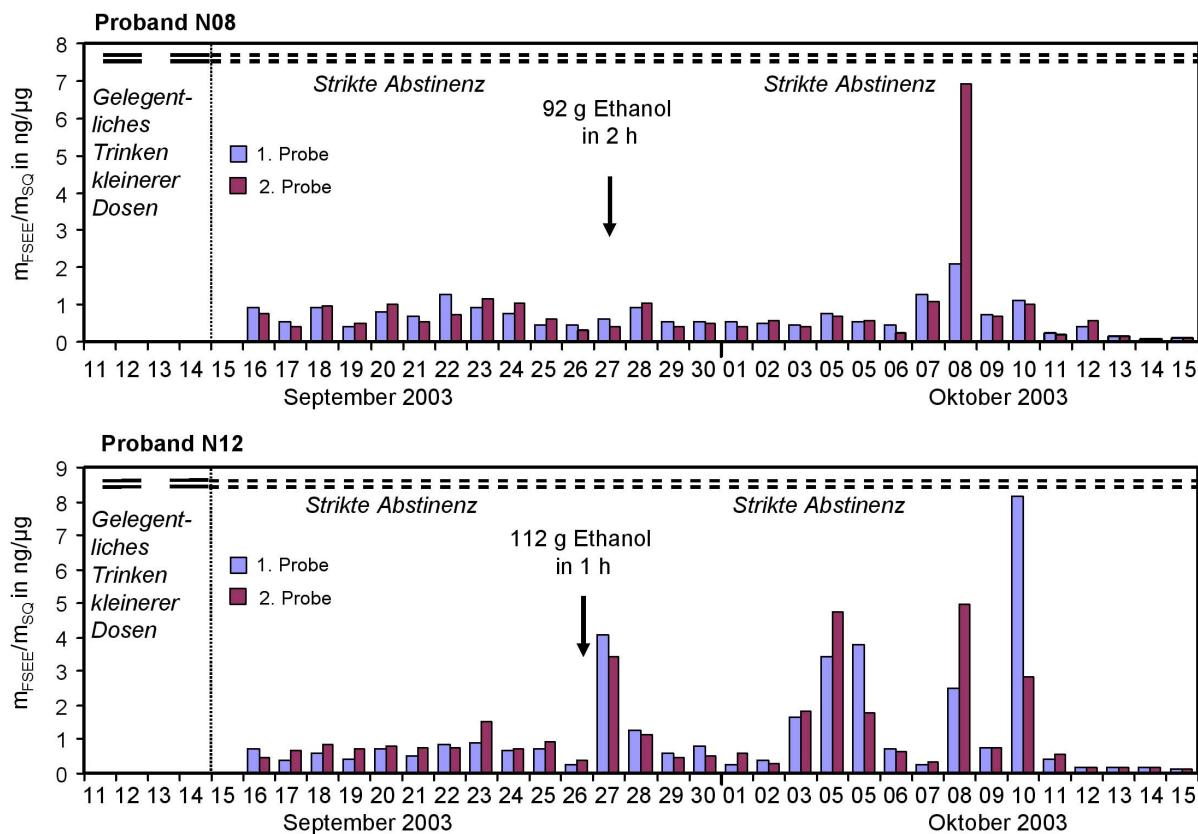


Abb. 45: Relative FSEE-Konzentrationen m_{FSEE}/m_{SQ} in den Hautoberflächenlipiden, die täglich von der Stirn der Probanden N08 (62, m) und N12 (33, m) mit Hilfe des Wischtests gewonnen wurden.

die im Bereich der Normaltrinker und Abstinenzler lagen. Es ergab sich insofern kein Hinweis auf eine drastische Änderung der Werte bei postmortalen Untersuchungen.

Um den zeitlichen Verlauf von m_{FSEE}/m_{SQ} nach einer größeren Einzeldosis Ethanol zu beobachten, wurde ein Experiment mit zwei Normaltrinkern (N08 und N12) durchgeführt. Nach strikter zweiwöchiger Abstinenz tranken die Freiwilligen innerhalb von 1-2 Stunden 92 g Ethanol (Bier und Weinbrand) bzw. 112 g Ethanol (Rotwein). Danach wurde für die Dauer von 3 Wochen wieder strikte Abstinenz eingehalten. Während der gesamten Dauer des Experiments wurden bei beiden Probanden täglich Wischproben von beiden Seiten der Stirn genommen und auf FSEE und Squalen untersucht. Auf den Einsatz von Cremes oder Lotionen wurde für die gesamte Versuchsdauer verzichtet. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 dargestellt. In der Woche vor dem Trinkereignis lagen die Werte in dem Bereich, der für Abstinenzler und Normaltrinker gefunden wurde. Die Proben, die am Tage nach der Alkoholdosis genommen wurden (18 bzw. 12 Stunden nach Trinkende), zeigten erhöhte Werte. Danach wurden über einen Zeitraum von ca. 1 Woche wieder niedrige Werte gefunden. Nach 9 Tagen (N08) bzw. 6 Tagen (N12) wurden wieder relativ hohe Werte gemessen, die

unter Schwankungen für 5-8 Tage erhöht blieben. Schließlich fielen die Werte auf ein sehr niedriges Niveau ab. Mit Ausnahme einiger besonders hoher Werte zeigte sich für die beiden Seiten der Stirn eine recht gute Übereinstimmung der Werte für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$.

Der Anstieg von $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ am Tage nach dem Trinken kann durch enzymatische oder unkatalysierte chemische Bildung der FSEE aus Fettsäuren und ethanolhaltigem Schweiß erklärt werden. Da im weiteren Verlauf von beiden Probanden kein Alkohol mehr getrunken wurde, muss der erneute Anstieg der Werte nach 9 bzw. 6 Tagen ebenfalls auf die Einzeldosis Ethanol zurückzuführen sein. Der zeitliche Abstand korrespondiert dabei gut mit den Literaturdaten bezüglich der Zeit, die zwischen Sebumproduktion und -exkretion vergeht [154]. Aus dem zeitlichen Verlauf folgt, dass für Personen mit täglichem Alkoholmissbrauch bis zu 14 Tage nach Abstinenzbeginn erhöhte Werte für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ gefunden werden sollten.

Der Verlauf der FSEE-Konzentrationen nach einer sehr hohen Dosis Alkohol konnte zusätzlich an einem Beispiel aus der Klinik verfolgt werden. Eine seit mehreren Jahren psychiatrisch auffällige 64-jährige Patientin wurde zu Hause leblos auf dem Boden liegend aufgefunden. Sie wurde erfolgreich reanimiert und es stellte sich heraus, dass sie aus einem Angstzustand heraus eine Flasche Schnaps im Sturztrunk geleert hatte. In der Blutprobe der Patientin, die im Institut für Rechtsmedizin der Charité toxikologisch untersucht wurde, ergab sich eine Blutalkoholkonzentration von 6,0 mg/g. Ab dem folgenden Tag wurden unter Einverständnis der Angehörigen täglich Wischproben auf der linken und der

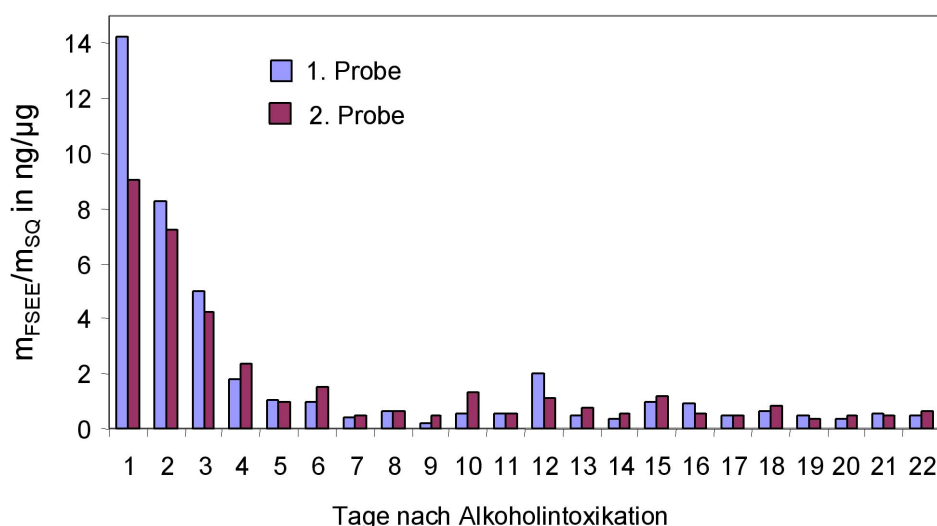


Abb. 46: Relative FSEE-Konzentrationen $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ in den Hautoberflächenlipiden, die täglich mittels Wischtest von der Stirn einer sonst wenig trinkenden psychiatrischen Patientin nach einer schweren Alkoholintoxikation gewonnen wurden.

rechten Seite der Stirn durchgeführt und die so gewonnenen Hautoberflächenlipide auf FSEE und Squalen untersucht. Abb. 46 zeigt den gefundenen Verlauf für $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$. Innerhalb von 5 Tagen sanken die Werte von einem anfangs sehr hohen Wert langsam ab. Für weitere 10 Tage wurden schwankende Werte gemessen, die zum Teil noch deutlich über dem Niveau lagen, das schließlich 16 Tage nach der Alkoholintoxikation erreicht wurde. Der im Vergleich zu dem vorher für die Probanden N08 und N12 beschriebenen veränderte Verlauf kann durch die extrem hohe Alkoholdosis, die zu einer verlängerten Abklingphase in den ersten Tagen nach der Alkoholdosis und erhöhten Werten bis 16 Tage nach Abstinenzbeginn führte, erklärt werden. Der ansonsten geringe Alkoholkonsum dieser Patientin wurde durch den CDT-Wert der am Tage nach der Intoxikation entnommenen Serumprobe von 1,2 % (Normalwerte zwischen 0 und 2,6 %) bestätigt.

4.7.2 Pflastertest auf FSEE

Für den Pflastertest wurden Drug of Abuse Patches der Firma PharmCheck (Haltom City, Texas, USA) verwendet. Das Vorgehen bei der Probennahme und die Aufarbeitung der Pflaster wurden in Abschnitt 3.3.3 und 3.4.3 beschrieben. Es wurden sieben Freiwillige einbezogen, von denen jeder einen Fragebogen ausfüllte, in dem das Trinkverhalten in der Woche vor Tragen des Pflasters, der Zeitpunkt des Anbringens und des Ablösens sowie das Konsumverhalten während der Tragedauer (5-8 Tage) protokolliert wurden. Da die

Tabelle 26: Relative FSEE-Konzentrationen $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ in Hautoberflächenlipiden, die mittels Pflastertest mit Squalen als natürlicher Bezugssubstanz erhalten wurden und Angaben zum Trinkverhalten vor und während des Tests für 7 Normaltrinker.

Proband	Alter, Geschl.	Ethanolkonsum in g		Tragedauer des Pflasters in Tagen	$m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ in ng/ μg *
		in der Woche vor dem Test	während des Tests		
BA	14, w	0	5	6	0,35
CM	25, w	306	189	6	0,31
FP	61, m	90	207	8	1,35
KP	59, w	72	135	5	0,19
RP	25, m	495	243	6	1,78
SM	36, w	153	225	6	0,50
VA	32, m	144	171	5	0,72

* Mittelwert aus zwei Messungen

Lipidmenge, die vom gesamten Pflaster (3 x 4,5 cm) während des Tragens aufgenommen wurde, relativ groß war und für Wiederholungsmessungen Material zurückbehalten werden sollte, wurde nur ein ca. 6 x 6 mm großer Abschnitt des Pflasters für die Analyse herangezogen. Bei Doppelbestimmung der FSEE und des Squalens wurden für m_{FSEE}/m_{SQ} Standardabweichungen zwischen 8 und 40 % erhalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt. In allen Fällen konnten FSEE nachgewiesen werden. Die Werte für m_{FSEE}/m_{SQ} lagen zwischen 0,19 und 1,78 ng/ μ g (Mittelwert 0,74 ng/ μ g) und damit etwas über denen, die bei dem Wischtest für Normaltrinker erhalten wurden (vgl. Abschnitt 4.7.1). Eine klare Korrelation zwischen m_{FSEE}/m_{SQ} und den Trinkmengen in der Woche vor und während des Tragens der Pflaster konnte nicht festgestellt werden. Allerdings zeigte der Proband mit der höchsten angegebenen Trinkmenge (RP) auch die höchsten Werte für m_{FSEE}/m_{SQ} .

In einem aus diesen Voruntersuchungen hervorgegangenen DFG-Projekt wird momentan untersucht, inwiefern Pflastertests mit einem anderen Probennahmesystemen (Sebutape®, Firma CuDerm, Dallas, USA) bei kürzerer Tragedauer der Pflaster eine Aussage über das Trinkverhalten in den Wochen vor der Probennahme zulassen.

Insgesamt bestätigten diese Versuche zur Analyse der FSEE in Hautoberflächenlipiden einerseits, dass die im Haar festgestellten Ethylester tatsächlich überwiegend aus dem Sebum stammen. Andererseits ergibt sich hierdurch eine weitere Möglichkeit zur retrospektiven Prüfung auf exzessiven Alkoholkonsum, die mit einer Nachweisdauer von ca. 2 Wochen die Lücke zwischen den gängigen Blutmarkern und Markern im Haar schließen könnte.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen zu Fettsäureethylestern (FSEE) im Haar und in Hautoberflächenlipiden in der vorliegenden Arbeit können die folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die Extraktion des Haars mit dem zweiphasigen Extraktionsmittel (n-Heptan/DMSO) führt zu einer effektiven Extraktion sowohl der FSEE als auch des Squalens.
- Der Einsatz der HS-SPME in Verbindung mit GC-MS erlaubt die empfindliche und quantitative Bestimmung einer großen Anzahl von Fettsäureethylestern im Haar in einem Analysengang. Gegenüber einer Festphasenextraktion mit anschließender GC-MS ist dieses Verfahren deutlich schneller und wirtschaftlicher.
- Vor der Analyse auf FSEE müssen die Haare äußerlich entfettet werden. Die Lagerung der Haarproben sollte tiefgekühlt und unter Ausschluss von Feuchtigkeit erfolgen.
- Mittels der in dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD-Methode kann die Squalenkonzentration im Haar und in Hautoberflächenlipiden einfach und genau bestimmt werden.
- Es konnte durch segmentweise Haaruntersuchungen unter Einbeziehung der Squalenkonzentrationen nachgewiesen werden, dass die Einlagerung der FSEE in erster Linie über das Sebum stattfindet. Die Resultate der Pflaster- und Wischtests bestätigten dieses Ergebnis.
- Aufgrund der Einlagerung über das Sebum ist bei segmentweiser Untersuchung von Haarproben keine zeitliche Zuordnung von Trink- oder Abstinenzphasen möglich.
- Durch Heranziehen der FSEE-Konzentrationen im Haar als Alkoholmarker kann unter Verwendung eines Cut-off-Wertes von 1 ng/mg für c_{i-FSEE} in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine Unterscheidung zwischen Personen, die chronisch exzessiven Alkoholkonsum betreiben und Normaltrinkern/Abstinenzlern erfolgen. Ein Cut-off von 0,4 ng/mg kann als Grenze zwischen der Gruppe der Normaltrinker und der Abstinenzler betrachtet werden. Allerdings können bei regelmäßiger Anwendung alkoholhaltiger Haarpflegemittel erhöhte Werte, bei gestörter Sebumproduktion oder verminderter Lipid-Aufnahmekapazität der Haare dagegen erniedrigte Werte auftreten, die zu einer falschen Zuordnung führen können.
- Die Einbeziehung der Squalenkonzentration als natürlicher Bezugssubstanz führt unter Heranziehen eines Cut-off-Wertes von 2 ng/ μ g für c_{i-FSEE}/c_{SQ} nach den bisherigen

Ergebnissen zu einer deutlich verbesserten Unterscheidbarkeit von exzessiven Alkoholkonsumenten auf der einen Seite und Normaltrinkern/Abstinenzlern auf der anderen. Insbesondere starke Trinker, bei denen relativ niedrige FSEE-Konzentrationen mit deutlich unter dem Durchschnitt liegenden Squalenkonzentrationen einhergehen, können dadurch eindeutiger zugeordnet werden.

- Im direkten Vergleich mit Labormarkern für Alkoholmissbrauch, die aus dem Blut bestimmt werden, ließ sich zeigen, dass FSEE im Haar als Marker für chronisch exzessiven Alkoholkonsum trotz der angesprochenen Schwächen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zumindest als nicht unterlegen erscheinen. Um hinreichend abgesicherte Aussagen in dieser Hinsicht treffen zu können und die vorgeschlagenen Cut-off-Werte statistisch abzusichern, müssen jedoch die Ergebnisse bereits begonnener und weiterer in der Planung befindlicher Studien abgewartet werden.
- Im Vergleich mit EtG im Haar als Alkoholmarker wurden bei der Mehrheit der untersuchten Fälle ähnliche qualitative Ergebnisse gefunden. Aufgrund der unterschiedlichen Einlagerungsmechanismen korrelieren die quantitativen Ergebnisse für FSEE und EtG im Haar jedoch nicht miteinander. Die Bestimmung beider Konzentrationen führt zu einer verbesserten Aussagesicherheit und ist daher anzustreben.
- Die zusätzlich zum Kopfhaar durchgeführte Untersuchung von Scham- Achsel- und Barthaar auf FSEE kann zu einer erhöhten Aussagesicherheit beitragen. Wenn kein Kopfhaar zur Verfügung steht, sollten mindestens zwei alternative Haarsorten untersucht werden.
- Erste Versuche mit Wischtests und Pflastertests zur Bestimmung relativer FSEE-Konzentrationen in Hautoberflächenlipiden lassen erkennen, dass auch diese geeignet sind, exzessiven Alkoholkonsum nachzuweisen. Das diagnostische Zeitfenster ist bei diesem Analysengut auf ca. 2 Wochen verkürzt und könnte die Lücke zwischen den gängigen Blutmarkern und FSEE im Haar schließen. In diesem Zusammenhang wird zurzeit am Institut für Rechtsmedizin der Charité in einem neuen Projekt unter Verwendung alternativer Probennahmesysteme weiter geforscht.
- Der Nachweis von FSEE im Haar ist problemlos postmortal möglich und eröffnet daher die Möglichkeit, bei Todesfällen Informationen über den Alkoholkonsum zu Lebzeiten zu erhalten, die in der Regel über Blutmarker wegen der schnell einsetzenden Hämolyse nicht mehr zu erhalten sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der großen Anzahl bekannter Alkoholismuskriterien im Blut besteht weiterhin großes Interesse an Alkoholmarkern, die entweder eine verbesserte Sensitivität/Spezifität zeigen oder aber ein neues diagnostisches Zeitfenster besitzen. In der vorliegenden Arbeit sollten Fettsäureethylester (FSEE) im Haar und in Hautoberflächenlipiden analytisch erfasst und hinsichtlich ihrer Eignung als Marker für exzessiven Alkoholkonsum evaluiert werden.

Aus einem Literaturüberblick über mögliche Alkoholmarker im Haar und über den aktuellen Stand der Forschung zu diesen Substanzen bzw. Substanzgruppen geht hervor, dass zurzeit nur Ethylglucuronid (EtG) und FSEE hierfür von Bedeutung sind. Die bisherigen analytischen Untersuchungen an FSEE als Alkoholmarker beschränkten sich auf die Bestimmung in Blut, Körpergewebe und Meconium, wobei methodisch in der Regel Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) nach Festphasenextraktion (SPE) zum Einsatz kam.

Haar als Probenmaterial ist für die Prüfung auf einen chronischen Alkoholmissbrauch besonders geeignet, da es durch die dauerhafte Einlagerung der Marker ein sehr breites diagnostisches Zeitfenster besitzt und wegen des gleichmäßigen Wachstums prinzipiell auch eine retrospektive, zeitaufgelöste Untersuchung ermöglicht. Eine nähere Betrachtung der morphologischen und physiologischen Grundlagen des Haarwachstums und der Einlagerungswege von Substanzen ins Haar zeigt allerdings, dass vereinfachte Vorstellungen über das Haar als Zeitschreiber des Substanzmissbrauchs nur beschränkt gültig sind. Bei lipophilen Substanzen wie den FSEE spielt das Sebum bei der Einlagerung eine bedeutende Rolle, auf dessen Bildung in den Talgdrüsen daher ein besonderes Augenmerk gerichtet wurde.

Als Analysenmethoden wurden die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit der GC-MS und die Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) gewählt. Das Prinzip der HS-SPME beruht auf der Anreicherung der Analyten an einer polymerbeschichteten Quarzfaser aus dem Dampfraum über der Probe und der anschließenden Desorption im Injektorblock des Gaschromatographen. Dieses Verfahren ist besonders für die Analyse mittelflüchtiger Substanzen geeignet.

Als Referenzverbindungen wurden 36 Ethylester von Fettsäuren mit 14 bis 20 C-Atomen unter Einbeziehung verzweigter (Iso- und Anteiso-Verbindungen) und ungesättigter Säuren synthetisiert und durch die Massenspektren charakterisiert. Zur Verwendung als innere

Standards wurden analog die deuterierten Ethylester (R-COO-C₂D₅) durch Veresterung mit C₂D₅OD hergestellt.

Es wurde ein auf HS-SPME und anschließender GC-MS basierendes analytisches Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe die 36 FSEE zusammen mit den deuterierten Analoga dieser Verbindungen in einem Analysengang bei hoher Empfindlichkeit und Selektivität gemessen werden können. Die direkte HS-SPME der Haarproben erwies sich für die Bestimmung der FSEE als ungeeignet. Daher wurden verschiedene der HS-SPME vorgeschaltete Extraktionsverfahren untersucht. Dabei ergab die 15-stündige Extraktion mit einem zweiphasigen, aus 2 ml n-Heptan und 0,5 ml DMSO bestehenden Gemisch bei 25°C nach Zusatz der deuterierten Standards die beste absolute Extraktionsausbeute bei guter Reproduzierbarkeit. Die Heptanphase wurde eingedampft und der Extrakt mit der optimierten HS-SPME-Methode gemessen.

Die Optimierung der HS-SPME-Methode ergab die folgenden experimentellen Parameter: Zusatz von 1 ml Phosphatpuffer pH 7,6 und 0,5 g NaCl zum Extraktionsrückstand, SPME-Temperatur 90°C, SPME-Dauer 30 min, Desorptionsdauer 5 min, Verwendung einer mit Polydimethylsiloxan (PDMS) und Partikeln aus Divinylbenzol (DVB) beschichteten SPME-Faser.

Weiterhin wurde ein HPLC-DAD-Verfahren zur Bestimmung des Squalengehaltes der Proben entwickelt, das sich durch eine hohe Empfindlichkeit bei großer Robustheit der Methode auszeichnet. Squalen wurde als natürliche Bezugssubstanz für die FSEE gewählt. Die analytischen Methoden wurden kalibriert und nach den Richtlinien der GTFCh validiert.

Die Untersuchung von 13 Alkoholikerhaarproben auf alle 36 FSEE ergab die Anwesenheit von 15 dieser Verbindungen, darunter neben sieben unverzweigten gesättigten Estern mit geradzahligem und ungeradzahligem Kohlenstoffanzahl auch zwei in Anteiso- und vier in Iso-Position verzweigte sowie ein einfach ungesättigter und ein doppelt ungesättigter Ester. Für die weiteren Untersuchungen wurden die vier in der höchsten Konzentration vorkommenden Ester Ethylmyristat (C14-Et), Ethylpalmitat (C16-Et), Ethyloleat (C18 Δ^9 -Et) und Ethylstearat (C18-Et) ausgewählt und zunächst deren Konzentrationssumme c_{i-FSEE} als Grundlage für die Zuordnung zu den Konsumentengruppen herangezogen. Für diese vier Ester ergaben sich Nachweisgrenzen zwischen 6 und 35 pg/mg und für Squalen eine Nachweisgrenze von 3 ng/mg. Für alle Analyten wurden im relevanten Konzentrationsbereich Kalibrationsfunktionen mit exzellenter Linearität erhalten.

Mit dem Verfahren wurden insgesamt 163 Haarproben von Abstinenzlern, Normaltrinkern, Patienten in der Alkoholentzugsbehandlung und Todesfällen mit bekanntem Alkoholmissbrauch zu Lebzeiten untersucht. Dabei wurden in allen Fällen FSEE festgestellt, wobei die Konzentration der aus dem Haar extrahierten FSEE (c_{i-FSEE}) bei Abstinenzlern 0,02 bis 1,21 ng/mg ($n = 18$, Mittelwert 0,27 ng/mg), bei Normaltrinkern 0,08 bis 1,96 ($n = 33$, Mittelwert 0,47 ng/mg), bei den Patienten in Entzugsbehandlung 0,20 bis 20,48 ng/mg ($n = 47$, Mittelwert 2,65 ng/mg) und bei den Todesfällen mit bekanntem Alkoholmissbrauch zu Lebzeiten 0,22 bis 30,60 ng/mg ($n = 65$, Mittelwert 4,98 ng/mg) betrug. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass für c_{i-FSEE} ein Cut-off von 1 ng/mg geeignet ist, um zwischen Normaltrinkern auf der einen und exzessiven Alkoholkonsumenten auf der anderen Seite zu unterscheiden. Ein Wert von 0,4 ng/mg kann als obere Grenze für Abstinenzler gelten. Es zeigte sich, dass die FSEE-Konzentrationen im Haar neben dem Trinkverhalten auch durch haarkosmetische Behandlungen beeinflusst werden und dass auch Scham-, Achsel-, Bart-, oder Körperhaare zur Analyse herangezogen werden können, falls kein Kopfhaar zur Verfügung steht.

Durch segmentweise Untersuchungen der Haarproben und Vergleich mit dem zeitlichen Verlauf des Trinkverhaltens sowie durch Einbeziehung der Squalenkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass unter den verschiedenen grundsätzlich möglichen Einlagerungsmechanismen für die Einlagerung der FSEE ins Haar der Route über das Sebum die mit Abstand größte Bedeutung zukommt. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Sebum, das mit n-Heptan von der Haaroberfläche abgewaschen wurde (externe FSEE, kurz e-FSEE) oder durch Pflaster- und Wischtests von der Haut in Form von Hautoberflächenlipiden gewonnen wurde, bestätigten dies.

Durch Einbeziehung der Squalen-Haarkonzentration c_{SQ} in die Bewertung durch Bildung relativer FSEE-Konzentrationen c_{i-FSEE}/c_{SQ} wurde erreicht, dass Fälle, in denen es aufgrund von Stoffwechselstörungen oder veränderter Lipid-Aufnahmekapazität des Haares zu erhöhten bzw. erniedrigten FSEE-Werten kam, richtig zugeordnet werden konnten. Für diese auf den Squalengehalt des Haars bezogenen relativen FSEE-Konzentrationen wurde ein Grenzwert von 2 ng/ μ g vorgeschlagen. Bei Werten, die oberhalb dieses Wertes liegen, kann mit relativ hoher Sicherheit von exzessivem Alkoholkonsum ausgegangen werden.

Aus der Untersuchung von 28 Haarproben auf FSEE und Ethylglucuronid (EtG) ging hervor, dass beide Parameter grundsätzlich als Alkoholmarker im Haar geeignet sind, aber aufgrund der unterschiedlichen Einlagerungswege der Substanzen nicht quantitativ korre-

lieren. Durch Messung beider Parameter kann die Aussagesicherheit hinsichtlich der Diagnose von chronischem Alkoholmissbrauch verbessert werden.

Im Vergleich mit gängigen Blutmarkern wie Leberenzymaktivitäten, dem Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT), dem mittleren korpuskularen Erythrozytenvolumen (MCV) oder Phosphatidylethanol ergab sich, dass FSEE im Haar als Alkoholmarker eine zumindest vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, sich aber durch ein verbreitertes diagnostisches Zeitfenster auszeichnen. Allerdings ist die Gefahr falsch positiver Ergebnisse bei häufigem Kontakt der Haare oder der Kopfhaut mit ethanolhaltigen Flüssigkeiten zu berücksichtigen. Die Erprobung der Methode in der forensischen Praxis, z. B. in der Fahreignungsprüfung, zeigte, dass die Methode bei Fällen, bei denen andere Marker zweifelhafte oder widersprüchliche Ergebnisse liefern, eine wertvolle Hilfe sein kann. Eine weitere wichtige Anwendung besteht in der postmortalen Untersuchung von Haarproben, da bei Todesfällen die gängigen Alkoholmarker im Blut aufgrund von Hämolyse in der Regel nicht mehr messbar sind. Einer breiten Anwendung steht bislang der hohe experimentelle Aufwand und damit der relativ hohe Preis entgegen.

Erste Versuche zur Bestimmung von relativen FSEE-Konzentrationen in Hautoberflächenlipiden, bei denen neben mit Wattestäbchen durchgeführten Wischtests auch Pflastertests zum Einsatz kamen, zeigten, dass diese ebenfalls grundsätzlich zum Nachweis von Alkoholmissbrauch geeignet sind. Die $m_{\text{FSEE}}/m_{\text{SQ}}$ -Werte fallen für die verschiedenen Konsumentengruppen in ähnliche Bereiche wie die $c_{\text{i-FSEE}}/c_{\text{SQ}}$ -Werte im Haar. An insgesamt drei Fällen wurden mit Hilfe der Wischtests nach einer einmaligen, größeren Alkoholdosis, die nach einer längeren Abstinenzphase aufgenommen wurde, Untersuchungen zur Kinetik der Ausscheidung von FSEE durch die Haut durchgeführt. Danach sollte ein chronischer Alkoholmissbrauch durch Wischtests bis ca. 14 Tage nach Abstinenzbeginn erkennbar sein.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Aderjan R (Hrsg). Marker missbräuchlichen Alkoholkonsums. Klinische und rechtliche Bedeutung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2000).
- [2] Musshoff F, Daldrup T. Determination of biological markers for alcohol abuse. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 713 (1998) 245-264.
- [3] Musshoff F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 781 (2002) 457-480.
- [4] Feuerlein W. Alkoholismus - Mißbrauch und Abhängigkeit. G. Thieme Verlag, Stuttgart (1989).
- [5] Aderjan R, Besserer K, Sachs H, Schmitt G, Skopp S. Ethyl glucuronide – A non-volatile ethanol metabolite in human hair. In Spiehler V (Hrsg). Proceedings of the 1994 Joint TIAFT/SOFT International Meeting, Oct. 31 to Nov. 4 1994 in Tampa/Florida, DABFT Newport Beach, CA (1995) 39-45.
- [6] Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Drönner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol Alcohol.* 35 (2000) 283-285.
- [7] Alt A, Janda I, Seidl S, Wurst FM. Determination of ethylglucuronide in hair samples. *Alcohol Alcohol.* 35 (2000) 313-314.
- [8] Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 128 (2002) 59-65.
- [9] Pragst F, Spiegel K, Sporkert F, Bohnenkamp M. Are there possibilities for the detection of chronically elevated alcohol consumption by hair analysis? A report about the state of investigation. *Forensic Sci Int.* 107 (2000) 201-223.
- [10] Singer MV, Teyssen S (Hrsg). Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten: Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1999).
- [11] Roine R, Salaspuro M. Marker für Alkoholismus und alkoholassoziierte Organschäden. In Seitz HK, Lieber CS, Simanowski UA (Hrsg). Handbuch Alkohol, Alkoholismus, Alkoholbedingte Organschäden. Barth-Verlag, Leipzig (1995) 93-120.
- [12] Agarwal DP. Biologische/genetische Marker des Alkoholismus. In Soyka M (Hrsg). Biologische Alkoholismusmarker. Chapman and Hall, Weinheim London (1995).
- [13] Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem.* 47 (2001) 13-27.
- [14] Nakahara Y, Kikura R, Takahashi K. Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties on incorporation rates into hair. *Biol Pharm Bull.* 18 (1995) 1223-1227.
- [15] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Drug analysis in scalp hair. II. A biochemical explanation for the endogeneous incorporation of xenobiotic substances and illicit drugs into anagen hairs. *Rechtsmedizin* 7 (1996) 1-5.
- [16] Gunnarsson T, Karlsson A, Hansson P, Johnson G, Alling C, Odham G. Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 705 (1998) 243-249.
- [17] Gustavsson L. Phosphatidylethanol formation: Specific effects of ethanol mediated via phospholipase D. *Alcohol Alcohol.* 30 (1995) 391-406.

- [18] Hoek JB, Thomas AP, Rooney TA, Higashi K, Rubin E. Ethanol and signal transduction in the liver. *FASEB J.* 6 (1992) 2386-2396.
- [19] Hansson P, Caron M, Johnson G, Gustavsson L, Alling C. Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res.* 21 (1997) 108-110.
- [20] Varga A, Hansson P, Lundqvist C, Alling C. Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers. *Alcohol Clin Exp Res.* 22 (1998) 1832-1837.
- [21] Boyer CS, Petersen DR. Enzymatic basis of transesterification of cocaine in the presence of ethanol: Evidence for the participation of microsomal carboxyesterases. *J Pharm Exp Ther.* 260 (1991) 939-946.
- [22] Dean RA, Christian CD, Sample RHB, Bosron WF. Human liver cocaine esterase: ethanol-mediated formation of cocaethylene. *FASEB J.* 5 (1991) 2735-2739.
- [23] Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T. Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J Anal Toxicol.* 15 (1991) 250-255.
- [24] DiGrigori GJ, Barbieri EJ, Ferko AP, Ruch EK. Prevalence of cocaethylene in the hair of pregnant women. *J Anal Toxicol.* 17 (1993) 445-446.
- [25] Niemala O, Israel Y, Mizoi Y, Fukunage T, Erikson C. Hemoglobin-acetaldehyde adducts in human volunteers following acute ethanol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res.* 14 (1990) 838-841.
- [26] Sillanaukee P, Seppä K, Koivula T. Association of a haemoglobin-acetaldehyde adduct with questionnaire results on heavy drinkers. *Alcohol Alcohol.* 26 (1991) 519-525.
- [27] Worrall S, de Jersey J, Wilce PA, Seppä K, Hurme L, Sillanaukee P. Comparison of carbohydrate-deficient transferrin, immunoglobulin A antibodies reactive with acetaldehyde-modified protein and acetaldehyde-modified albumin with conventional markers of alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 22 (1998) 1921-1926.
- [28] Sorrell MF, Tuma DJ. The functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents. *Ann NY Acad Sci.* 492 (1987) 50-62.
- [29] Jelinkova D, Deyl Z, Miksik I, Tagliaro F. Capillary electrophoresis of hair protein modified by alcohol intake in laboratory rats. *J Chromatogr A.* 709 (1995) 111-119.
- [30] Watson RR, Solkoff D, Wang JY, Seeto K. Detection of ethanol consumption by ELISA assay measurement of acetaldehyde adducts in murine hair. *Alcohol.* 16 (1998) 279-284.
- [31] Musshoff F, Daldrup T, Bonte W, Leitner A, Lesch OM. Salsolinol and norsalsolinol in human urine samples. *Pharmacol Biochem Behav.* 58 (1997) 545-550.
- [32] Bendtsen P, Jones AW, Helander A. Urinary excretion of methanol and 5-hydroxytryptophol as biochemical markers of recent drinking in the hangover state. *Alcohol Alcohol.* 33 (1998) 431-438.
- [33] Helander A, Beck O, Borg S. Determination of urinary 5-hydroxytryptophol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 579 (1992) 340-345.
- [34] Jones AW, Helander A. Changes in the concentrations of ethanol, methanol and metabolites of serotonin in two successive urinary voids from drinking drivers. *Forensic Sci Int.* 93 (1998) 127-134.
- [35] Voltaire A, Beck O, Borg S. Urinary 5-hydroxytryptophol: a possible marker of recent alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 16 (1992) 281-285.

- [36] Pullarkat RK, Raguthu S. Elevated urinary dolichol levels in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 9 (1985) 28-30.
- [37] Roine RP, Turpeinen U, Ylikahri R, Salaspuro M. Urinary dolichol – a new marker of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 11 (1987) 525-527.
- [38] Roine RP, Nykänen I, Ylikahri R, Heikkilä J, Suokas A, Salaspuro M. Effect of alcohol on blood dolichol concentration. *Alcohol Clin Exp Res.* 13 (1989) 519-522.
- [39] Gonzalez-Reimers E, Aleman-Valls MR, Barroso-Guerrero F, Santolaria-Fernandez F, Lopez-Lirola A, Garcia-Valdecasas CE, Jarque-Lopez A, Rodriguez-Gaspar M. Hair zinc and copper in chronic alcoholics. *Biol Trace Elem Res.* 85 (2002) 269-275.
- [40] Madea B, Mußhoff F (Hrsg). *Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht.* Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln (2004).
- [41] Kamil IA, Smith NJ, Williams RT. A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl glucuronide. *Biochem J.* 51 (1952) 64-70.
- [42] Jaakonmaki PI, Knox KL, Horning EC, Horning MG. The characterization by gas-liquid chromatography of ethyl β -D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man. *Eur J Pharmacol.* 1 (1967) 63-70.
- [43] Kozu T. Gas chromatographic analysis of ethyl- β -D-glucuronide in human urine. *Shinzu Igaku Zasshi.* 21 (1973) 595-601.
- [44] Schmitt G, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide: an unusual metabolite in humans. Synthesis, analytical data and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol.* 19 (1995) 91-94.
- [45] Nishikawa M, Tsuchihashi H, Miki A, Katagi M, Schmitt G, Zimmer H, Keller T, Aderjan R. Determination of ethyl glucuronide, a minor metabolite of ethanol, in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 726 (1999) 105-110.
- [46] Zimmer H, Schmitt G, Aderjan R. Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 26 (2002) 11-16.
- [47] Schmitt G, Droenner P, Skopp G, Aderjan R. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci.* 42 (1997) 1099-1102.
- [48] Wurst FM, Schüttler R, Kempter C, Seidl S, Gilg T, Jachau K, Alt A. Can ethyl glucuronide be determined in post-mortem body fluids and tissues? *Alcohol Alcohol.* 34 (1999) 262-263.
- [49] Stephanson N, Dahl H, Helander A, Beck O. Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 24 (2002) 645-651.
- [50] Droenner P, Schmitt G, Aderjan R, Zimmer H. A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans. *Forensic Sci Int.* 126 (2002) 24-29.
- [51] Schmitt G, Drönnner P, Aderjan R. Blood sample containing 1,44 permille ethanol doesn't contain ethyl glucuronide – a case report. *Blutalkohol* 34 (1997) 371-378.
- [52] Sachs H. Drogennachweis in Haaren. In Kijewski H (Hrsg). *Proceedings of the Symposium „Das Haar als Spur – Spur der Haare“, 24. November 1993 in Göttingen.* Verlag Schmidt-Römhild, Lübeck (1997) 119-133.

- [53] Skopp G, Schmitt G, Drönner P, Aderjan R. Trinkverhalten und Haaranalyse. In Daldrup T, Mußhoff F (Hrsg). Proceedings of the 1995 GTFCh Symposium, Apr. 20-22 1995 in Mosbach/Baden. Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim (1995) 175-179.
- [54] Yegles M, Panarotto E, Labarthe A, Wennig R. Determination by GC-MS/NCI of ethylglucuronide in hair. In Pragst F, Aderjan R (Hrsg). Beiträge zum XII. Symposium der GTFCh, 26.-28. April 2001 in Mosbach. Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim (2001) 299-303.
- [55] Yegles M, Wennig R, Auwärter V, Hartwig S, Vater H, Pragst F. Comparison of ethylglucuronide and fatty acid ethyl esters concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. Forensic Sci Int. 145 (2004) 167-173.
- [56] Weinmann W, Kühnle T, Störzel M, Janda I, Alt A. Post-column Lösungsmittelzugabe für LC-ESI/MS/MS am Beispiel des Ethylglucuronids. In F. Pragst, R. Aderjan (Hrsg). Beiträge zum XII. Symposium der GTFCh, 26.-28. April 2001 in Mosbach. Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim (2001) 72-75.
- [57] Lange LG, Bergmann SR, Sobel BE. Identification of fatty acid ethyl esters as a product of rabbit myocardial ethanol metabolism. J Biol Chem. 256 (1981) 12968-12973.
- [58] Lange LG. Non-oxidative ethanol metabolism by fatty acid ethyl ester synthase. Alcohol Alcohol. Suppl. 1 (1991) 103-105.
- [59] Lange LG. Mechanism of fatty acid ethyl ester formation and biological significance. Ann NY Acad Sci. 625 (1991) 802-805.
- [60] De Jersey J, Treloar T. Biosynthesis and possible pathological significance of fatty acid ethyl esters. Alcohol Alcohol. Suppl. 2 (1994) 171-176.
- [61] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. Clin Chem. 43 (1997) 1527-1534.
- [62] Beckemeier ME, Bora PS. Fatty acid ethyl esters: potentially toxic products of myocardial ethanol metabolism. J Mol Cell Cardiol. 30 (1998) 2487-2494.
- [63] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. Prog Lipid Res. 37 (1998) 307-316.
- [64] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: Nonoxidative ethanol metabolites with emerging biological and clinical significance. Lipids. 34 (1999) 281-285.
- [65] Laposata M. Fatty acid ethyl esters: current facts and speculations. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 60 (1999) 313-315.
- [66] Soderberg BL, Laposata M. Fatty acid ethyl esters: markers of ethanol intake. Am Clin Lab. 20 (2001) 18-20.
- [67] Laposata M, Hasaba A, Best CA, Yoerger DM, McQuillan BM, Salem RO, Refaai MA, Soderberg BL. Fatty acid ethyl esters: recent observations. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 67 (2002) 193-196.
- [68] Best CA, Laposata M. Fatty Acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. Front Biosci. 8 (2003) E202-217.
- [69] Doyle KM, Bird DA, Al-Salihi S, Hallaq Y, Cluette-Brown JE, Goss KA, Laposata M. Fatty acid ethylesters are present in human serum after ethanol ingestion. J Lipid Res. 35 (1994) 428-437.
- [70] Laposata EA, Scherrer DE, Lange LG. Fatty acid ethyl esters in adipose tissue. A laboratory marker for alcohol-related death. Arch Pathol Labor Med. 113 (1989) 762-766.

- [71] Dan L, Laposata M. Ethyl palmitate and ethyl oleate are the predominant fatty acid ethyl esters in the blood after ethanol ingestion and their synthesis is differentially influenced by the extracellular concentrations of their corresponding fatty acids. *Alcohol Clin Exp Res.* 21 (1997) 286-292.
- [72] Doyle KM, Cluette-Brown JE, Dube DM, Bernhardt TG, Morse CR, Laposata M. Fatty acid ethylesters in the blood as markers of ethanol intake. *JAMA.* 276 (1996) 1152-1156.
- [73] Soderberg BL, Sicinska ET, Blodget E, Cluette-Brown JE, Suter PM, Schupisser T, Vetter W, Laposata M. Preanalytical variables affecting the quantification of fatty acid ethyl esters in plasma and serum samples. *Clin Chem.* 45 (1999) 2183-2190.
- [74] Laposata M, Szczepiorkowski ZM, Brown JE. Fatty acid ethyl esters: Non-oxidative metabolites of ethanol. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 52 (1995) 87-91.
- [75] Bird DA, Kabakibi A, Laposata M. The distribution of fatty acid ethyl esters among lipoproteins and albumin in human serum. *Alcohol Clin Exp Res.* 21 (1997) 602-605.
- [76] Yamazaki K, Gilg T, Kauert G, v. Meyer L, Eisenmenger W. Nonoxidative ethanol and methanol changes in the heart and brain tissue of alcohol abusers. *Jpn J Legal Med.* 51 (1997) 380-387.
- [77] Klein J, Karaskov T, Koren G. Fatty acid ethyl esters: a novel biological marker for heavy in utero ethanol exposure: A case report. *Ther Drug Monit.* 21 (1999) 644-646.
- [78] Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem.* 49 (2003) 133-136.
- [79] Katalog Sigma-Aldrich Chemie GmbH 2002-2003. *Biochemikalien und Reagenzien.*
- [80] Lange LG. Nonoxidative ethanol metabolism: formation of fatty acid ethyl esters by cholesterol esterase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79 (1982) 3954-3957.
- [81] Mogelson S, Pieper SJ, Kinnunen PM, Lange LG. Partial purification and product characterization of fatty acid ethyl ester synthases in rabbit myocardium. *Biochim Biophys Acta.* 798 (1984) 144-148.
- [82] Mogelson S, Lange LG. Nonoxidative ethanol metabolism in rabbit myocardium: purification to homogeneity of fatty acyl ethyl ester synthase. *Biochemistry.* 23 (1984) 4075-4081.
- [83] Bora PS, Spilburg CA, Lange LG. Purification to homogeneity and characterization of major fatty acid ethyl ester synthase from human myocardium. *FEBS Lett.* 258 (1989) 236-239.
- [84] Wright M, Bieser KJ, Kinnunen PM, Lange LG. Nonoxidative ethanol metabolism in human leukocytes: detection of fatty acid ethyl ester synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 142 (1987) 979-985.
- [85] Laposata EA, Scherrer DE, Mazow C, Lange LG. Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *J Biol Chem.* 262 (1987) 4653-4657.
- [86] Bora PS, Spilburg CA, Lange LG. Identification of a satellite fatty acid ethyl ester synthase from human myocardium as a glutathione S-transferase. *J Clin Invest.* 84 (1989) 1942-1946.
- [87] Hungund BL, Goldstein DB, Villegas F, Cooper TB. Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. *Biochem Pharmacol.* 37 (1988) 3001-3004.
- [88] Isenberg KE, Bora PS, Zhou X, Wu X, Moore BW, Lange LG. Nonoxidative ethanol metabolism: expression of fatty acid ethyl ester synthase-III in cultured neural cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 185 (1992) 938-943.
- [89] Manautou JE, Carlson GP. Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation in vivo and in vitro in rat lung. *Toxicology.* 70 (1991) 303-312.

- [90] Bora PS, Wu X, Spilburg CA, Lange LG. Purification and characterization of fatty acid ethyl ester synthase-II from human myocardium. *J Biol Chem.* 267 (1992) 13217-13221.
- [91] Bora PS, Lange LG. Molecular mechanism of ethanol metabolism by human brain to fatty acid ethyl esters. *Alcohol Clin Exp Res.* 17 (1993) 28-30.
- [92] Board P, Smith S, Green J, Coggan M, Suzuki T. Evidence against a relationship between fatty acid ethyl ester synthase and the Pi class glutathione S-transferase in humans. *J Biol Chem.* 268 (1993) 15655-15658.
- [93] Bora PS, Guruge BL, Miller DD, Chaitman BR, Ruyle MS. Purification and characterization of human heart fatty acid ethyl ester synthase/carboxylesterase. *J Mol Cell Cardiol.* 9 (1996) 2027-2032.
- [94] Tsujita T, Okuda H. Fatty acid ethyl ester-synthesizing activity of lipoprotein lipase from rat postheparin plasma. *J Biol Chem.* 269 (1994) 5884-5889.
- [95] Tsujita T, Okuda H. The synthesis of fatty acid ethyl ester by carboxylester lipase. *Eur J Biochem.* 224 (1994) 57-62.
- [96] Treloar T, Madden LJ, Winter JS, Smith JL, de Jersey J. Fatty acid ethyl ester synthesis by human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta.* 1299 (1996) 160-166.
- [97] Kaphalia BS, Green SM, Ansari GA. Fatty acid ethyl and methyl ester synthases, and fatty acid anilide synthase in HepG2 and AR42J cells: interrelationships and inhibition by tri-o-tolyl phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 159 (1999) 134-141.
- [98] Kaphalia BS, Ansari GA. Purification and characterization of rat hepatic microsomal low molecular weight fatty acid ethyl ester synthase and its relationship to carboxylesterases. *J Biochem Mol Toxicol.* 15 (2001) 165-171.
- [99] Mericle KA, Kaphalia BS, Ansari GA. Differential inhibition of hepatic, pancreatic, and plasma fatty acid ethyl ester synthase by tri-o-tolylphosphate in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 179 (2002) 119-125.
- [100] Dan L, Cluette-Brown JE, Kabakibi A, Laposata M. Quantitation of the mass of fatty acid ethyl esters synthesized by Hep G2 cells incubated with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 22 (1998) 1125-1131.
- [101] Kabakibi A, Morse CR, Laposata M. Fatty acid ethyl esters and HepG2 cells: intracellular synthesis and release from the cells. *J Lipid Res.* 39 (1998) 1568-1582.
- [102] Saghir M, Werner J, Laposata M. Rapid in vivo hydrolysis of fatty acid ethyl esters, toxic nonoxidative ethanol metabolites. *Am J Physiol.* 273 (1997) G184-190.
- [103] Diczfalusy MA, Bjorkhem I, Einarsson C, Alexson SE. Formation of fatty acid ethyl esters in rat liver microsomes. Evidence for a key role for acyl-CoA: ethanol O-acyltransferase. *Eur J Biochem.* 259 (1999) 404-411.
- [104] Diczfalusy MA, Bjorkhem I, Einarsson C, Hillebrant CG, Alexson SE. Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans. *J Lipid Res.* 42 (2001) 1025-1032.
- [105] Calabrese V, Rizza V. Effects of L-carnitine on the formation of fatty acid ethyl esters in brain and peripheral organs after short-term ethanol administration in rat. *Neurochem Res.* 24 (1999) 79-84.
- [106] Heith AM, Morse CR, Tsujita T, Volpacelli SA, Flood JG, Laposata M. Fatty acid ethyl ester synthase catalyzes the esterification of ethanol to cocaine. *Biochem Biophys Res Commun.* 208 (1995) 549-554.
- [107] Hamamoto T, Yamada S, Hirayama C. Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas; implication in alcoholic pancreatic damage. *Biochem Pharmacol.* 39 (1990) 241-245.

- [108] Manautou JE, Buss NJ, Carlson GP. Oxidative and non-oxidative metabolism of ethanol by the rabbit lung. *Toxicol Lett.* 62 (1992) 93-99.
- [109] Tsujita T, Okuda H. Fatty acid ethyl ester synthase in rat adipose tissue and its relationship to carboxylesterase. *J Biol Chem.* 267 (1992) 23489-23494.
- [110] Laposata M, Kabakibi A, Walden MP, Cluette-Brown JE, Nanji AA, Refaai MA, Werner J, Nanji AA. Differences in the fatty acid composition of fatty acid ethyl esters in organs and their secretions. *Alcohol Clin Exp Res.* 24 (2000) 1488-1491.
- [111] Bird DA, Szczepiorkowski ZM, Trace VC, Laposata M. Low-density lipoprotein reconstituted with fatty acid ethyl esters as a physiological vehicle for ethyl ester delivery to intact cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 19 (1995) 1265-1270.
- [112] Bird DA, Laposata M, Hamilton JA. Binding of ethyl oleate to low density lipoprotein, phospholipid vesicles, and albumin: a ¹³C NMR study. *J Lipid Res.* 37 (1996) 1449-1458.
- [113] Chang S, Borensztajn J. Binding of fatty acid ethyl esters to albumin for transport to cells in culture. *Biochim Biophys Acta.* 1436 (1999) 491-498.
- [114] Best CA, Cluette-Brown JE, Teruya M, Teruya A, Laposata M. Red blood cell fatty acid ethyl esters: a significant component of fatty acid ethyl esters in the blood. *J Lipid Res.* 44 (2003) 612-620.
- [115] Saghir M, Blodget E, Laposata M. The hydrolysis of fatty acid ethyl esters in low-density lipoproteins by red blood cells, white blood cells and platelets. *Alcohol.* 19 (1999) 163-168.
- [116] Aleryani S, Kabakibi A, Cluette-Brown J, Laposata M. Fatty acid ethyl ester synthase, an enzyme for nonoxidative ethanol metabolism, is present in serum after liver and pancreatic injury. *Clin Chem.* 42 (1996) 24-27.
- [117] Gorski NP, Nouraldin H, Dube DM, Preffer FI, Dombkowski DM, Villa EM, Lewandrowski KB, Weiss RD, Hufford C, Laposata M. Reduced fatty acid ethyl ester synthase activity in the white blood cells of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 20 (1996) 268-274.
- [118] Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science.* 231 (1986) 497-499.
- [119] Lange LG, Sobel BE. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest.* 72 (1983) 724-73.
- [120] Werner J, Saghir M, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL, Laposata M. Linkage of oxidative and nonoxidative ethanol metabolism in the pancreas and toxicity of nonoxidative ethanol metabolites for pancreatic acinar cells. *Surgery.* 129 (2001) 736-744.
- [121] Werner J, Laposata M, Fernandez-del Castillo C, Saghir M, Iozzo RV, Lewandrowski KB, Warshaw AL. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. *Gastroenterology.* 113 (1997) 286-294.
- [122] Werner J, Saghir M, Warshaw AL, Lewandrowski KB, Laposata M, Iozzo RV, Carter EA, Schatz RJ, Fernandez-Del Castillo C. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283 (2002) G65-73.
- [123] Pfutzer RH, Tadic SD, Li HS, Thompson BS, Zhang JY, Ford ME, Eagon PK, Whitcomb DC. Pancreatic cholesterol esterase, ES-10, and fatty acid ethyl ester synthase III gene expression are increased in the pancreas and liver but not in the brain or heart with long-term ethanol feeding in rats. *Pancreas.* 25 (2002) 101-106.
- [124] Haber PS, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC. Fatty acid ethyl esters increase rat pancreatic lysosomal fragility. *J Lab Clin Med.* 121 (1993) 759-764.

- [125] Kaphalia BS, Ansari GA. Fatty acid ethyl esters and ethanol-induced pancreatitis. *Cell Mol Biol.* 47 (2001) 173-179.
- [126] Szczepiorkowski ZM, Dickersin GR, Laposata M. Fatty acid ethyl esters decrease human hepatoblastoma cell proliferation and protein synthesis. *Gastroenterology.* 108 (1995) 515-522.
- [127] Hasaba A, Laposata M. The synthesis and secretion of fatty acid ethyl esters from HepG2 cells are stimulated by lipoproteins and albumin. *Alcohol Clin Exp Res.* 25 (2001) 338-343.
- [128] Gubitosi-Klug RA, Gross RW. Fatty acid ethyl esters, nonoxidative metabolites of ethanol, accelerate the kinetics of activation of the human brain delayed rectifier K⁺ channel, Kv1.1. *J Biol Chem.* 271 (1996) 32519-32522.
- [129] Bearer CF, Gould S, Emerson R, Kinnunen P, Cook CS. Fetal alcohol syndrome and fatty acid ethyl esters. *Pediatr Res.* 31 (1992) 492-495.
- [130] Kinnunen PM, Lange LG. Identification and quantitation of fatty acid ethyl esters in biological specimens. *Anal Biochem.* 140 (1984) 567-576.
- [131] Bernhardt TG, Cannistraro PA, Bird DA, Doyle KM, Laposata M. Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatog. B Biomed Appl.* 675 (1996) 189-196.
- [132] Salem RO, Cluette-Brown JE, Hasaba A, Laposata M. Effect of specimen anticoagulant and storage on measurement of serum and plasma fatty acid ethyl ester concentrations. *Clin Chem.* 47 (2001) 126-127.
- [133] DePergola G, Kjellstrom C, Holm C, Conradi N, Pettersson P, Bjorntorp P. The metabolism of ethyl esters of fatty acids in adipose tissue of rats chronically exposed to ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 15 (1991) 184-189.
- [134] Spiegel K. Untersuchungen zum Nachweis alkoholspezifisch metabolisierter Substanzen aus menschlichen Haaren mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin (1997).
- [135] Bjorntorp P, Depergola G, Sjoberg C, Pettersson P, Hallgren P, Bostrom K, Helander KG, Seidell J. Alcohol consumption and synthesis of ethyl esters of fatty acids in adipose tissue. *J Intern Med.* 228 (1990) 557-562.
- [136] Bearer CF, Lee S, Salvator AE, Minnes S, Swick A, Yamashita T, Singer LT. Ethyl linolate in meconium: A biomarker for prenatal ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 23 (1999) 487-493.
- [137] Koren G, Chan D, Klein J, Karaskov T. Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco smoke, and ethanol. *Ther Drug Monit.* 24 (2002) 23-25.
- [138] Moore CM, Lewis D. Fatty acid ethyl esters in meconium: biomarkers for the detection of alcohol exposure in neonates. *Clin Chim Acta.* 312 (2001) 235-237.
- [139] Swift JA. Morphology and histochemistry of human hair. In Jollès P, Zahn H, Höcker H (Hrsg). *Formation and structure of human hair*, 1. Edition. Birkhäuser Verlag, Basel (1997) 149-175.
- [140] Benner KU. *Der Körper des Menschen*. Weltbild Verlag GmbH, Augsburg (1991) 50.
- [141] Powell J, Stone N, Dawber RPR. *Hair and scalp diseases*. The Parthenon Publishing Group Inc., New York (2002) 10.
- [142] Powell BC, Rogers GE. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. In Jollès P, Zahn H, Höcker H (Hrsg). *Formation and structure of human hair*, 1. Edition. Birkhäuser Verlag, Basel (1997) 59-148.

- [143] Baden HP. Hair keratin. In Orfanos CE, Happle R (Hrsg). Hair and hair diseases, 3. Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1990) 45-71.
- [144] Robbins CR. Chemical and Physical Behavior of Human Hair, 3. Edition. Springer-Verlag, New York USA (1994).
- [145] Wertz PW, Downing DT. Integral lipids of mammalian hair. *Comp Biochem Physiol B*. 92 (1989) 759-761.
- [146] Mieczkowski T, Newel R. Statistical examination of hair color as a potential biasing factor in hair analysis. *Forensic Sci Int*. 107 (2000) 13-38.
- [147] Castanet J, Ortonne JP. Hair melanin and hair color. In Jollès P, Zahn H, Höcker H (Hrsg). Formation and structure of human hair, 1. Edition. Birkhäuser Verlag, Basel (1997) 209-226.
- [148] Joseph RE Jr, Su TP, Cone EJ. In vitro binding studies of drugs to hair: Influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and africoid hair. *J Anal Toxicol*. 20 (1996) 338-344.
- [149] Forslind B. The growing anagen hair. In Orfanos CE, Happle R (Hrsg). Hair and hair diseases, 3. Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1990) 73-97.
- [150] Parakkal PF. Catagen and telogen phases of the growth cycle. In Orfanos CE, Happle R (Hrsg). Hair and hair diseases, 3. Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1990) 99-116.
- [151] Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporkert F. Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments – a time table of drug exposure? *Forensic Sci Rev*. 10 (1998) 81-111.
- [152] Orfanos CE. Androgenic alopecia: clinical aspects and treatment. In Orfanos CE, Happle R (Hrsg). Hair and hair diseases, 3. Edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1990) 485-527.
- [153] Attenberger A, Würfl O. Fachkunde für Friseure, 3. überarbeitete Auflage. Ernst Kieser GmbH, Augsburg (1981) 36.
- [154] Thody AN, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev*. 69 (1989) 383-416.
- [155] Downing DT, Steward ML, Wertz PW, Colton SW, Abraham W, Strauss JS. Skin lipids: An update. *J Invest Dermatol*. 88 (1987) 2s-6s.
- [156] Heymann E. Haut, Haar und Kosmetik. Hirzel-Verlag, Stuttgart (1994).
- [157] Steward ME. Sebaceous lipids. *Seminars Dermatol*. 11 (1992) 100-105.
- [158] Baumgartner WA, Hill VA, Blahd WH. Hair Analysis for Drugs of Abuse. *J Forensic Sci*. 34 (1989) 1433-1453.
- [159] Henderson GL. Mechanism of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int*. 63 (1993) 19-29.
- [160] Bhatnagar V, Anjaiah S, Prui N, Ramaihah A. pH of melanosomes of B16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 307 (1993) 183-192.
- [161] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forensic Sci Int*. 84 (1997) 25-35.
- [162] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: VI. Mögliche Einflüsse der Hautfunktionen. *Rechtsmedizin*. 8 (1997) 2-6.
- [163] Koren G, Klein J, Forman R, Graham K. Hair analysis of cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. *J Clin Pharmacol*. 32 (1992) 671-675.

- [164] Wang WL, Cone EJ. Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. *Forensic Sci Int.* 70 (1995) 39-51.
- [165] Mieczkowski T. Distinguishing passive contamination from active cocaine consumption: assessing the occupational exposure of narcotics officers to cocaine. *Forensic Sci Int.* 84 (1997) 87-111.
- [166] Baumgartner WA, Hill VA. Hair Analysis for Drugs of Abuse: Decontamination Issue. Conference Proceeding, NIDA-conference on hair (1990).
- [167] Pötsch L, Skopp G, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: III. Veränderungen des Opiat- und Kokaingehaltes in Haaren von Drogenkonsumenten nach einmaliger Blondierung oder Dauerwellenbehandlung. *Rechtsmedizin.* 7 (1997) 113-116.
- [168] Yegles M, Marson Y, Wennig R. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sci Int.* 107 (2000) 87-92.
- [169] Kidwell DA, Blanco MA, Smith FP. Cocaine detection in a university population by hair analysis and skin swab testing. *Forensic Sci Int.* 84 (1997) 75-86.
- [170] Röhrich J, Zorntlein S, Pötsch L, Skopp G, Becker J. Effect of the shampoo Ultra Clean on drug concentrations in human hair. *Int J Legal Med.* 113 (2000) 102-106.
- [171] Skopp G, Pötsch L, Möller MR. Zum Suchtmittelnachweis in Haaren: V. Auswirkung von Sonne, Regen und Wind auf den Drogengehalt in Kopfharen von Drogenkonsumenten - ein Pilotprojekt. *Rechtsmedizin.* 7 (1997) 176-179.
- [172] Skopp G, Pötsch L, Mauden M. Stability of cannabinoids in hair samples exposed to sunlight. *Clin Chem.* 46 (2000) 1846-1848.
- [173] Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction – Theory and Practice. Wiley-VCH, New York USA (1997).
- [174] Husek P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J Chromatogr B.* 717 (1998) 57-91.
- [175] Sporkert F. Anwendungen der Headspace-Festphasenmikroextraktion in der forensischen Analytik unter besonderer Berücksichtigung der Haaranalyse. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin (2001).
- [176] Alzaga R, Pena A, Ortiz L, Bayona JM. Determination of linear alkylbenzensulfonates in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 999 (2003) 51-60.
- [177] Pawliszyn J (Hrsg), Smith RM. Applications of Solid Phase Microextraction. RSC Chromatography Monographs Series, Royal Society of Chemistry, Cambridge UK (1999).
- [178] Llompart M, Li K, Fingas M. Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile and semi-volatile pollutants in water and air. *J Chromatogr A.* 824 (1998) 53-61.
- [179] Pichini S, Altieri I, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P. Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material. *Forensic Sci Int.* 84 (1997) 243-252.
- [180] Namera A, Watanabe T, Yashiki M, Iwasaki Y, Kojima T. Simple analysis of tetracyclic antidepressants in blood using headspace-solid-phase microextraction and GC/MS. *J Anal Toxicol.* 22 (1998) 396-400.
- [181] Camarasu CC, Mezei-Szuts M, Varga GB. Residual solvents determination in pharmaceutical products by GC-HS and GC-MS-SPME. *J Pharm Biomed Anal.* 18 (1998) 623-638.

- [182] Engewald W, Struppe HG, Baugh PJ (Hrsg). Gaschromatographie. Eine anwenderorientierte Darstellung. Vieweg-Verlag, Wiesbaden (1997).
- [183] Otto M. Analytische Chemie. Verlag Wiley-VCH, Weinheim (2000).
- [184] Budzikiewicz H. Massenspektrometrie. Verlag Wiley-VCH, Weinheim (1998).
- [185] DeHoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry: Principles and Applications, 2. Edition. John Wiley & Sons, Chichester (2001).
- [186] McLafferty FW, Turecek F. Interpretation von Massenspektren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1995).
- [187] Aced G, Möckel HJ. Liquidchromatographie, 1. Auflage. Verlag Wiley-VCH, Weinheim (1991).
- [188] Meyer V. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 8. Auflage. Salle, Frankfurt/Main Aarau (1999).
- [189] Skoog DA, Leary JJ. Instrumentelle Analytik. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1996).
- [190] Huber L, George SA (Hrsg). Diode Array Detection in HPLC. Chromatographic science series Vol. 62, Marcel Dekker, Inc., New York (1993).
- [191] Blau K, Halket JM (Hrsg). Handbook of Derivatives for Chromatography. John Wiley & Sons, Chichester (1993) 16.
- [192] Musshoff F, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. Forensic Sci Int. 133 (2003) 32-38.
- [193] Kintz P, Cirimele V, Tracqui A, Mangin P. Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymphetamine and 3,4-methylendioxyamphetamine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl. 670 (1995) 162-166.
- [194] Sporkert F, Pragst F. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. Forensic Sci Int. 107 (2000) 129-148.
- [195] Sporkert F, Pragst F. Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Appl. 746 (2000) 255-264.
- [196] Dogliotti M, Liebowitz M, Downing DT, Strauss JS. Nutritional influences of pellagra on sebum composition. Br J Dermatol. 97 (1977) 25-28.
- [197] Nordstrom KM, Labows JN, McGinley KJ, Leyden JJ. Characterization of wax esters, triglycerides, and free fatty acids of follicular casts. J Invest Dermatol. 86 (1986) 700-705.
- [198] Saint-Leger D, Bague A, Lefebvre E, Cohen E, Chivot M. A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. II. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acne patients. Br J Dermatol. 114 (1986) 543-552.
- [199] Wille JJ, Kydonieus A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 16 (2003) 176-187.
- [200] Downie MM, Kealey T. Lipogenesis in the human sebaceous gland: glycogen and glycerophosphate are substrates for the synthesis of sebum lipids. J Invest Dermatol. 111 (1998) 199-205.
- [201] Sulpice JC, Férézou J. Squalene isolation by HPLC and quantitative comparison by HPLC and GLC. Lipids. 19 (1984) 631-635.

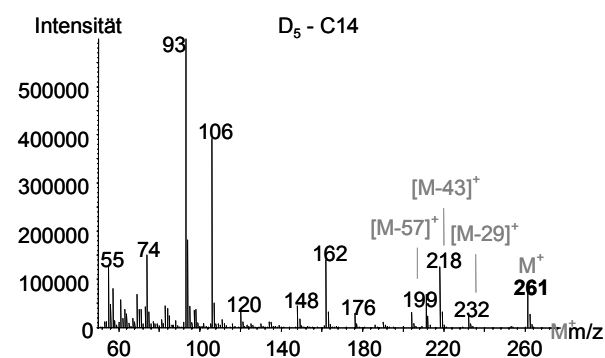
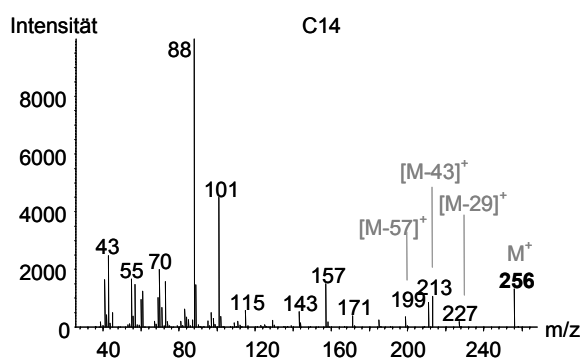
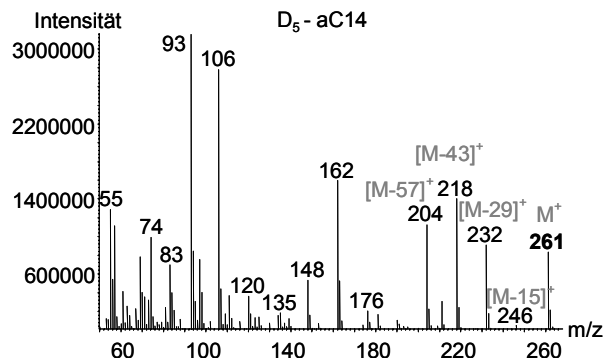
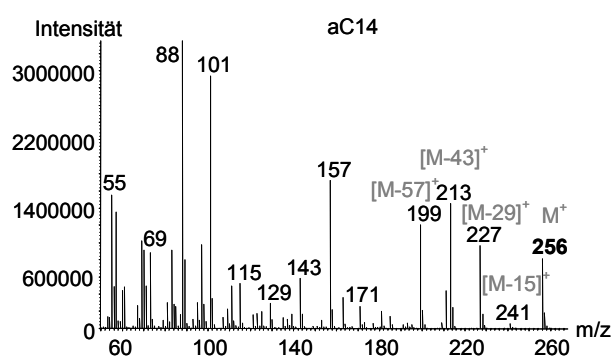
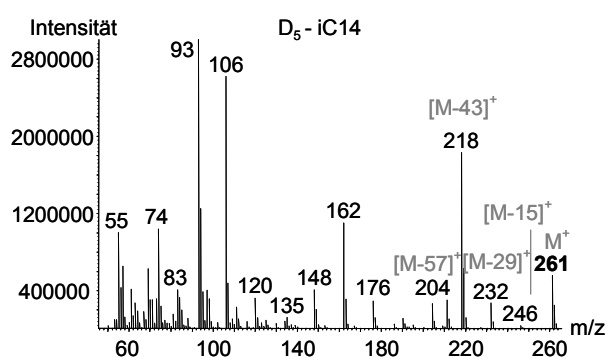
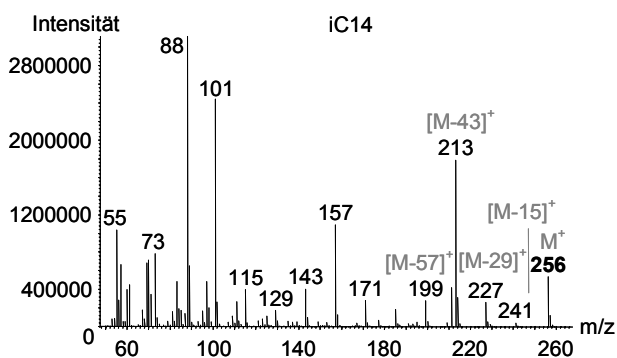
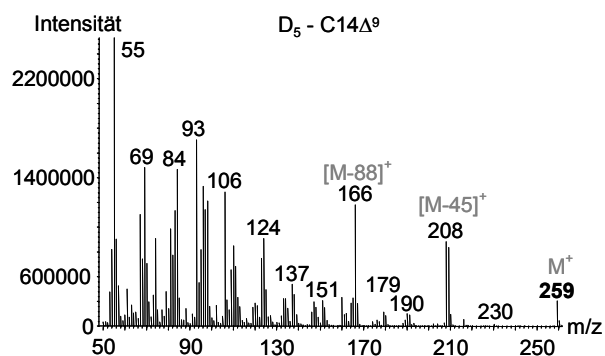
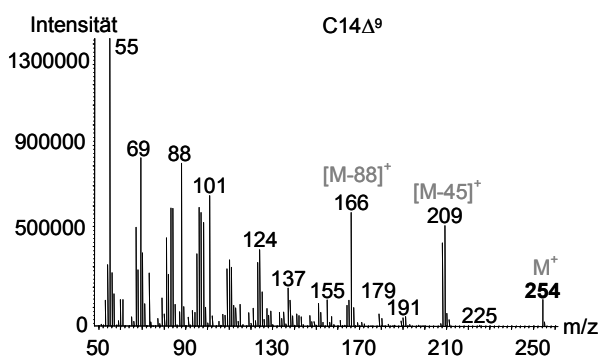
- [202] Passi S, De Pita O, Puddu P, Littarru GP. Lipophilic antioxidants in human sebum and aging. *Free Radic Res.* 36 (2002) 471-477.
- [203] Goodpaster JV, Drumheller BC, Benner Jr BA. Evaluation of extraction techniques for the forensic analysis of human scalp hair using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J Forensic Sci.* 48 (2003) 299-306.
- [204] Mudiyansele JV, Hamburger M, Elsner P, Thiele JJ. Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol.* 120 (2003) 915-922.
- [205] Wertz PW, Downing DT. Integral lipids in hair. *Lipids.* 23 (1988) 878-881.
- [206] Wertz PW. Integral lipids of hair and stratum corneum. In Jollès P, Zahn H, Höcker H (Hrsg). *Formation and structure of human hair*, 1. Edition. Birkhäuser Verlag, Basel (1997).
- [207] Mezey E, Imbembo AL, Potter JJ, Rent KC, Lombardo R, Holt PR. Endogenous ethanol production and hepatic disease following jejunoileal bypass for morbid obesity. *Am J Clin Nutr.* 28 (1975) 1277-1283.
- [208] Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 119 (2000) 1340-1347.
- [209] Al-Awadhi A, Wasfi IA, Al Reyami F, Al-Hatali Z. Autobrewing revisited: endogenous concentrations of blood ethanol in residents of the United Arab Emirates. *Sci Justice.* 44 (2004) 149-152.
- [210] Chan D, Bar-Oz B, Pellerin B, Paciorek C, Klein J, Kapur B, Farine D, Koren G. Population baseline of meconium fatty acid ethyl esters among infants of nondrinking women in Jerusalem and Toronto. *Ther Drug Monit.* 25 (2003) 271-278.
- [211] Chan D, Klein J, Karaskov T, Koren G. Fetal Exposure to Alcohol as Evidenced by Fatty Acid Ethyl Esters in Meconium in the Absence of Maternal Drinking History in Pregnancy. *Ther Drug Monit.* 26 (2004) 474-481.
- [212] Wollwachs/Wollwachsalkohole – Monographie, Parmentier GmbH & Co KG, Frankfurt am Main (2003), Homepage der Deutschen Lanolin Gesellschaft, www.parmentier.de
- [213] Hartwig S, Auwärter V, Pragst F. Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int.* 131 (2003) 90-97.
- [214] Hartwig S, Auwärter V, Pragst F. Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.* 38 (2003) 163-167.
- [215] Ebling FJ. Hair follicles and associated glands as androgen targets. *Clin Endocrinol Metab.* 15 (1986) 319-339.
- [216] Barth JH, Ridden J, Philpott MP, Greenall MJ, Kealey T. Lipogenesis by isolated human apocrine sweat glands: testosterone has no effect during long-term organ maintenance. *J Invest Dermatol.* 92 (1989) 333-336.
- [217] Rollins DE, Wilkins DG, Krueger GG, Augsburg MP, Mizuno A, O'Neal C, Borges CR, Slawson MH. The effect of hair color on the incorporation of codeine into human hair. *J Anal Toxicol.* 27 (2003) 545-551.
- [218] Strauss JS, Stranieri AM, Farrell LN, Downing DT. The effect of marked inhibition of sebum production with 13cis-retinoic acid on skin surface lipid composition. *J Invest Dermatol.* 74 (1980) 66-67.

- [219] Wurst FM, Alexson S, Wolfersdorf M, Bechtel G, Forster S, Alling C, Aradottir S, Jachau K, Huber P, Allen JP, Auwärter V, Pragst F. Concentration of Fatty acid ethyl esters in hair of alcoholics: Comparison to other biological state markers and self reported ethanol intake. *Alcohol Alcohol.* 39 (2004) 33-38.
- [220] Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Lê T, Lapière C. Patterns of follicular sebum excretion rate during lifetime. *Acta Dermatol Res.* 279 (1987) 104-107.

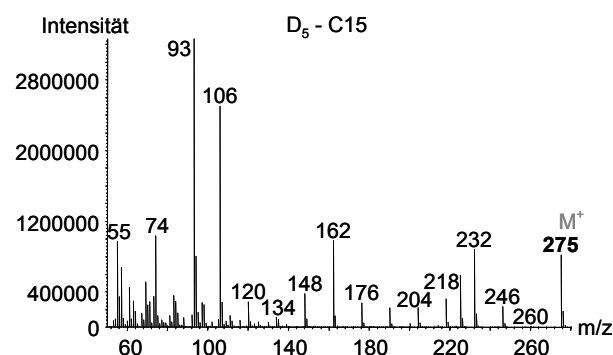
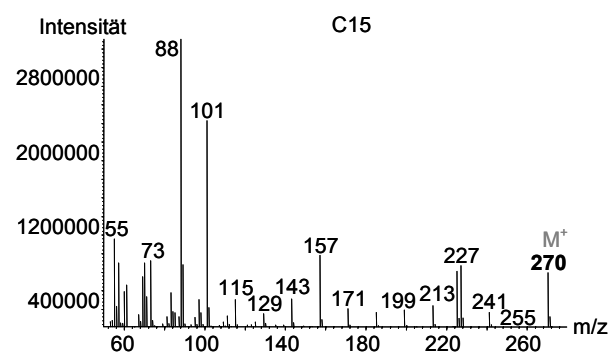
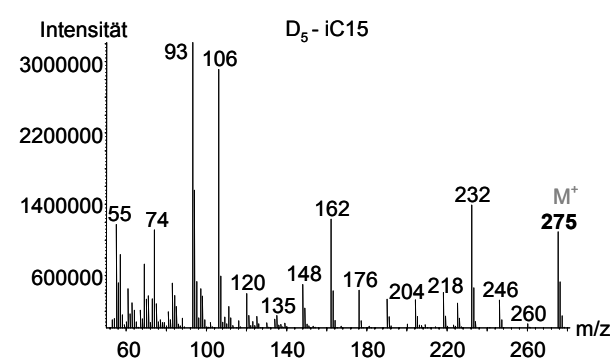
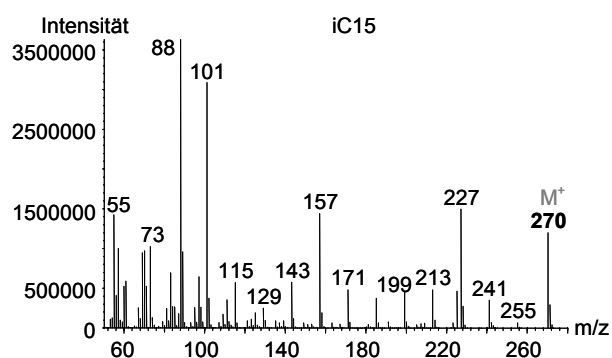
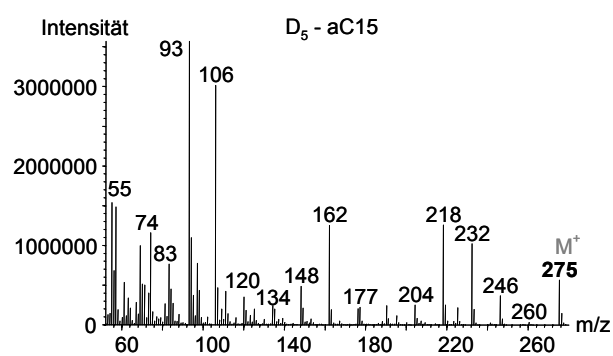
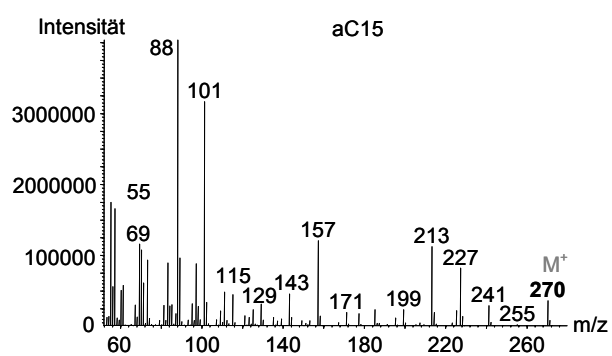
8 ANHANG

Massenspektren von Fettsäureethylestern und deren D₅-Derivaten

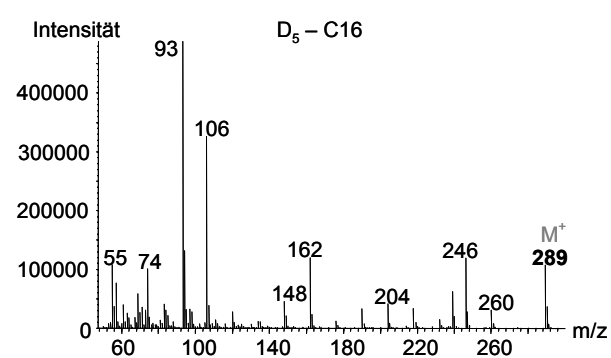
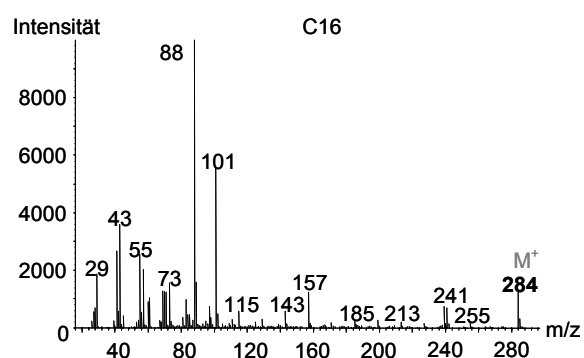
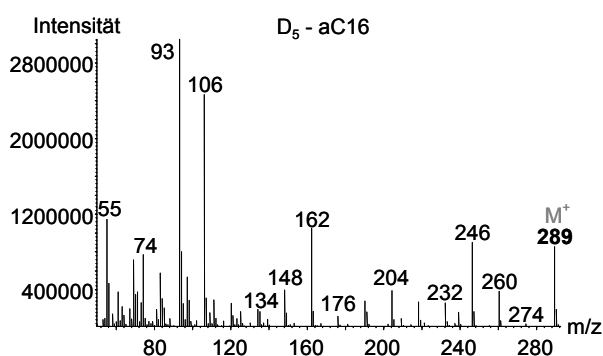
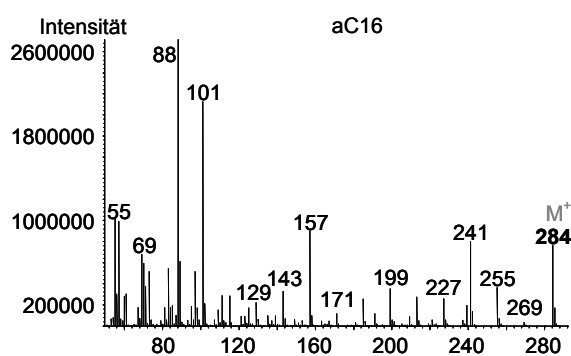
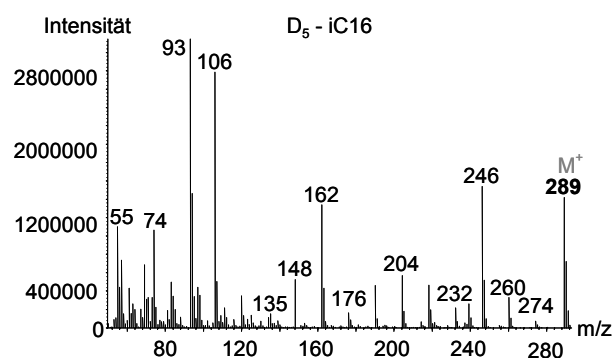
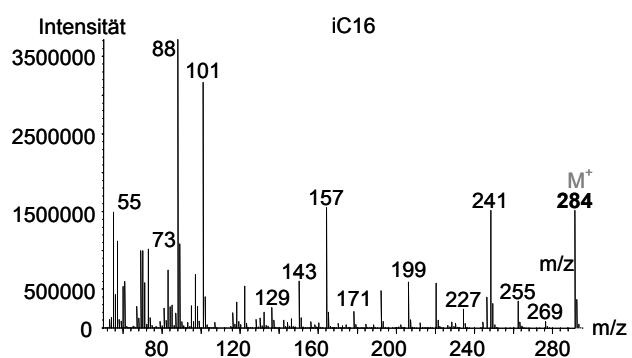
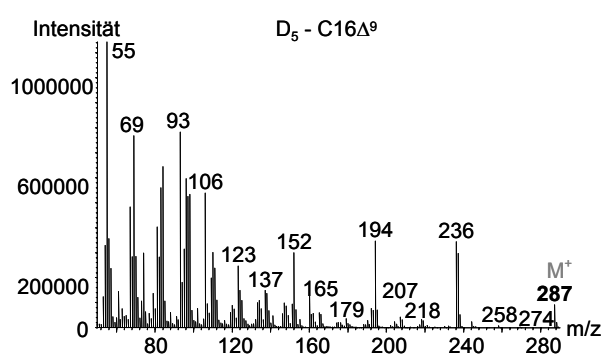
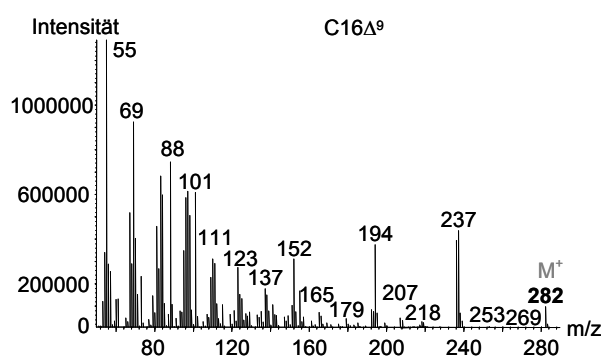
a) Massenspektren der FSEE mit 14 + 2 C-Atomen



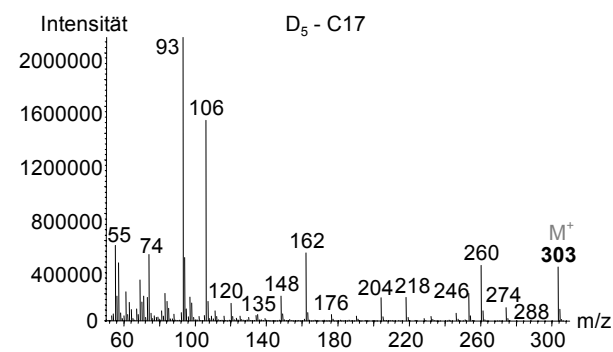
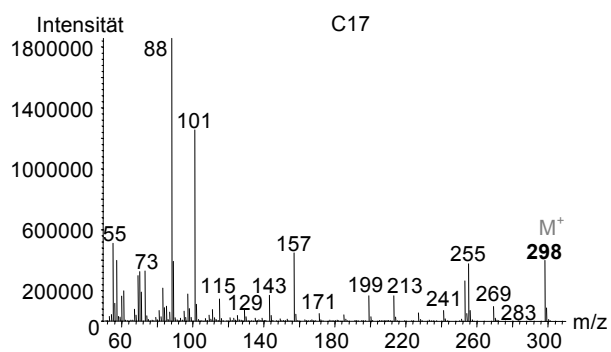
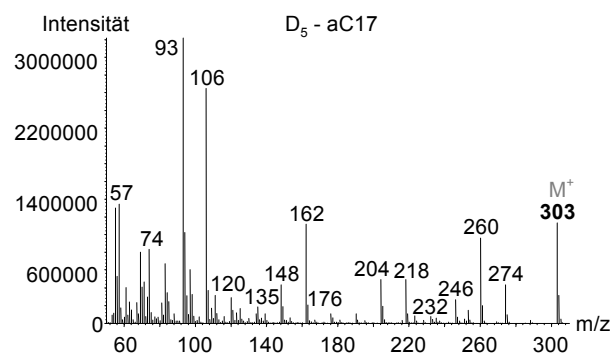
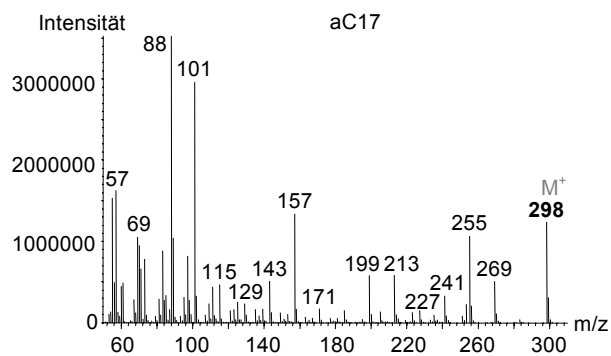
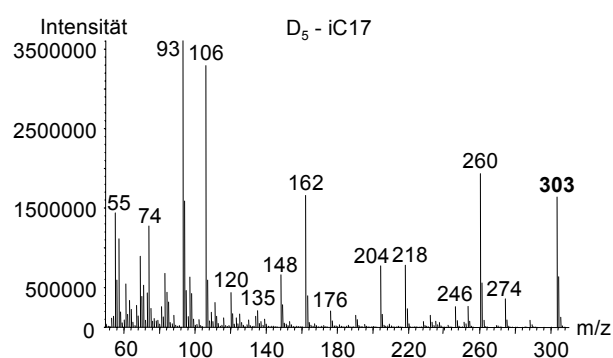
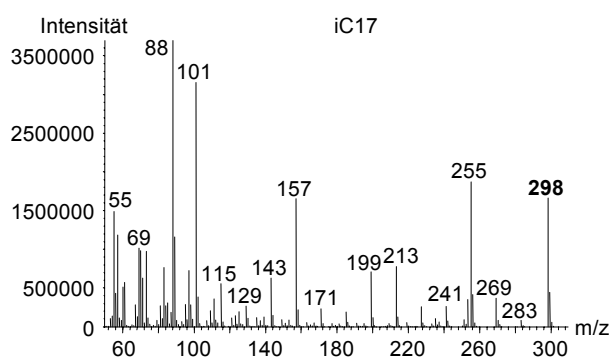
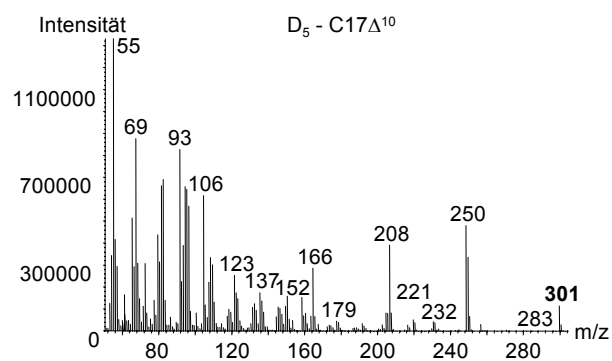
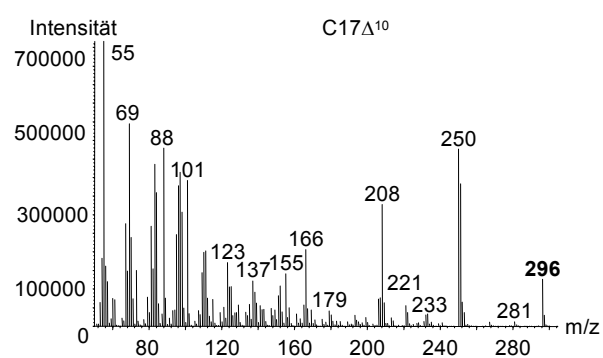
b) Massenspektren der FSEE mit 15 + 2 C-Atomen



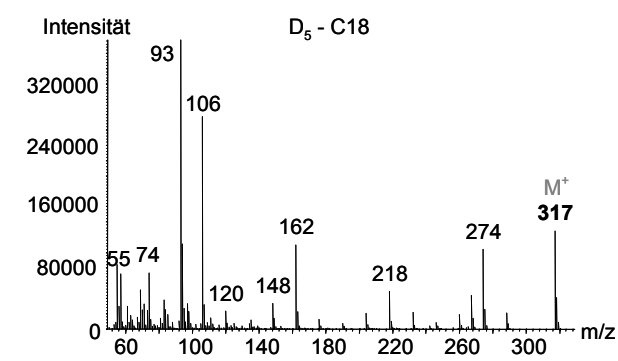
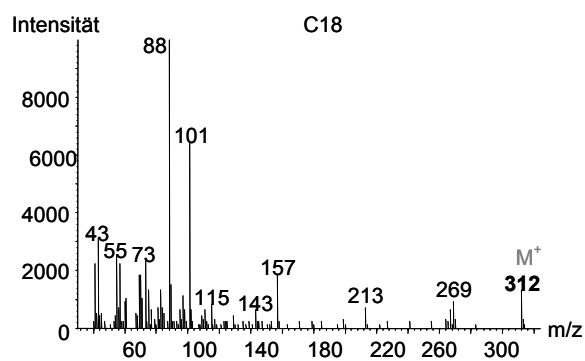
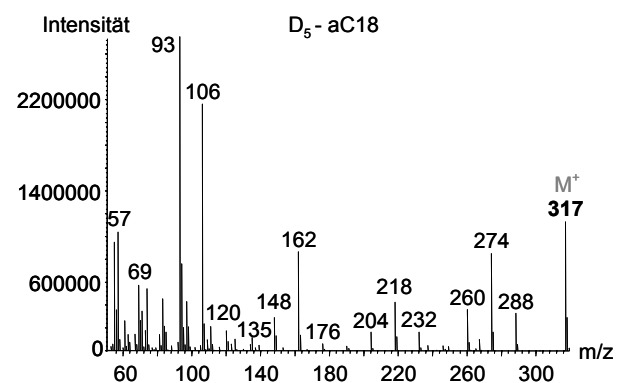
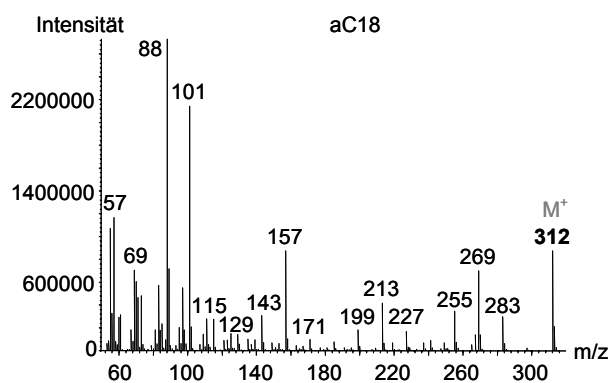
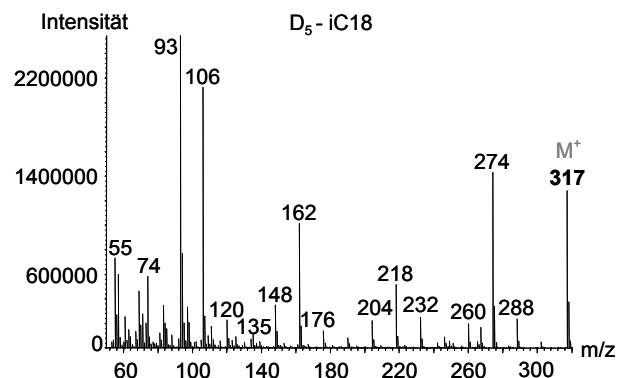
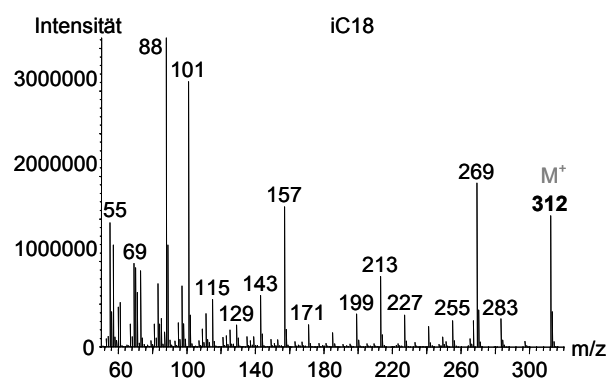
c) Massenspektren der FSEE mit 16 + 2 C-Atomen



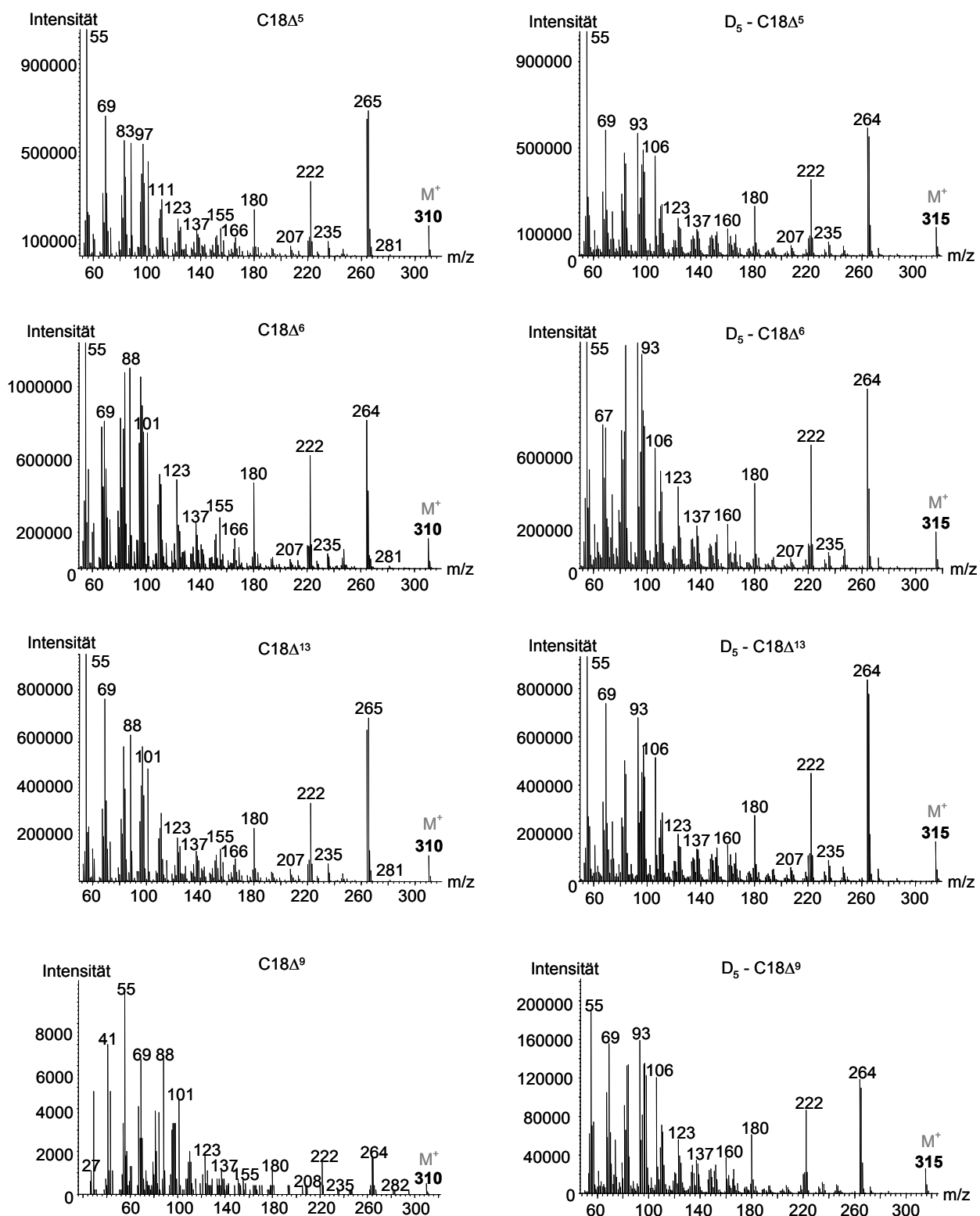
d) Massenspektren der FSEE mit 17 + 2 C-Atomen



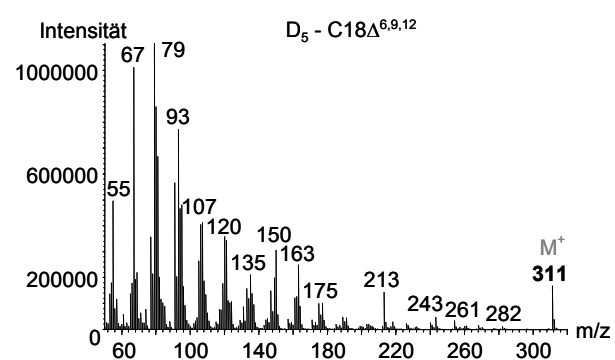
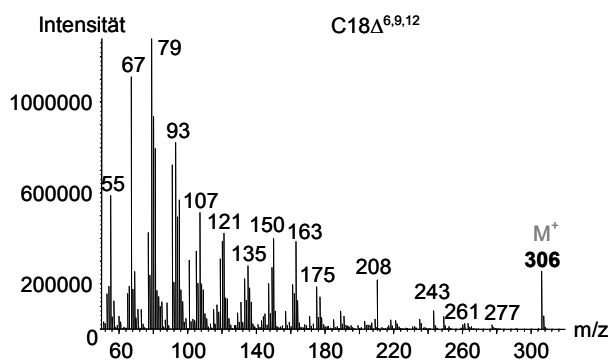
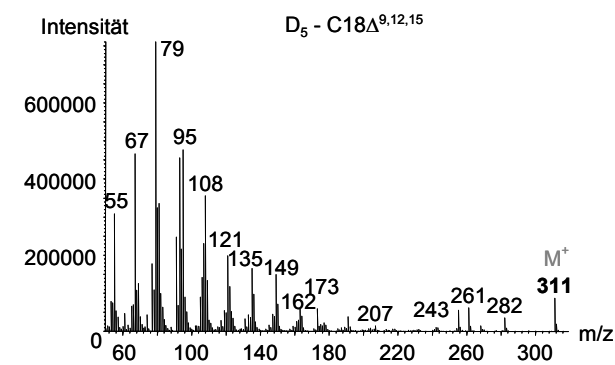
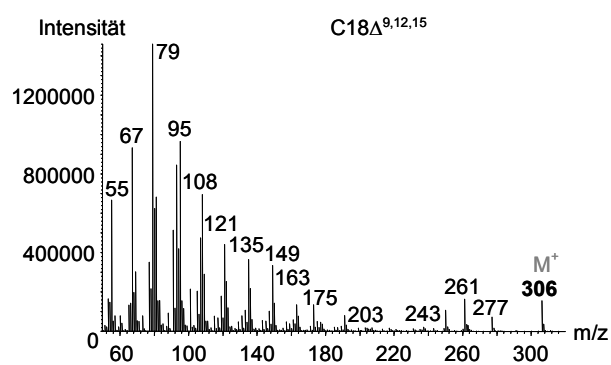
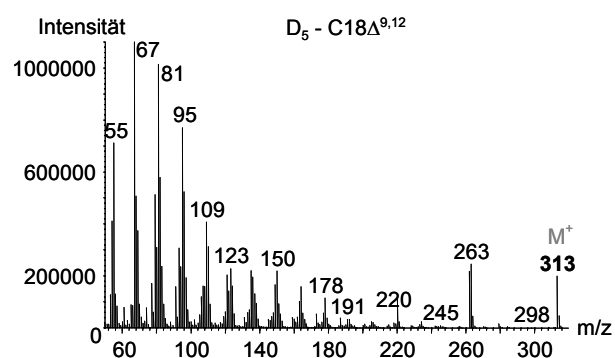
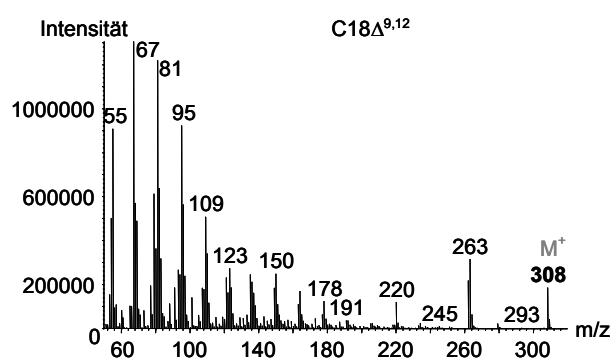
e) Massenspektren der gesättigten FSEE mit 18 + 2 C-Atomen



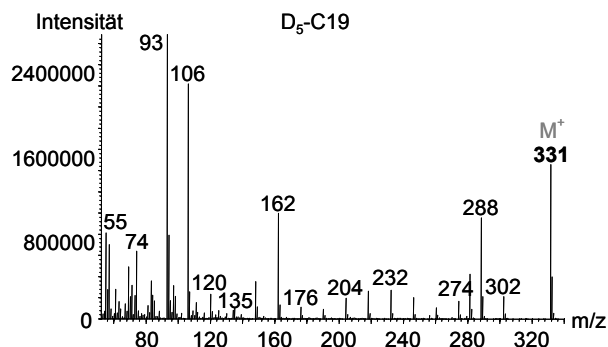
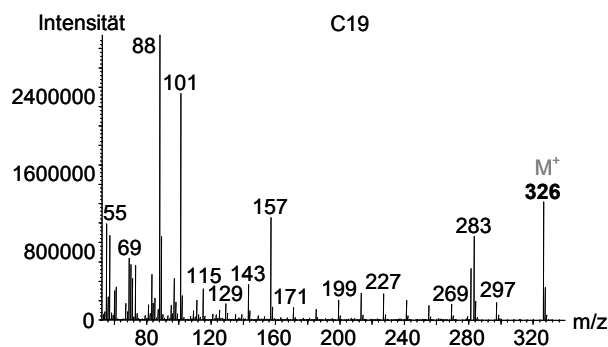
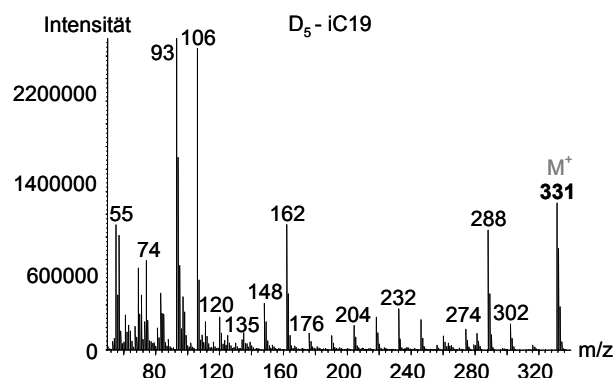
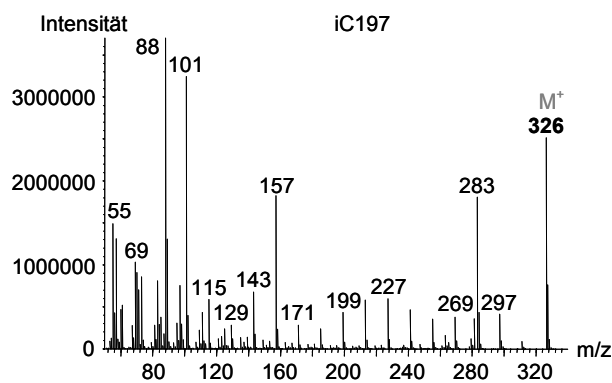
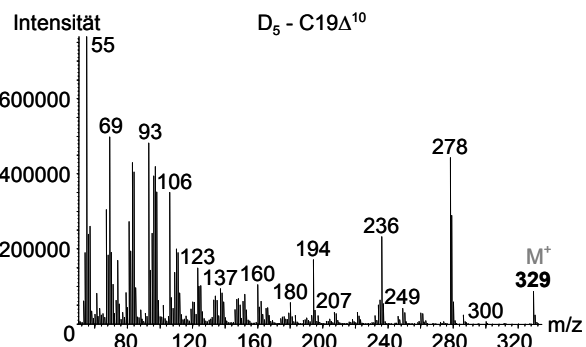
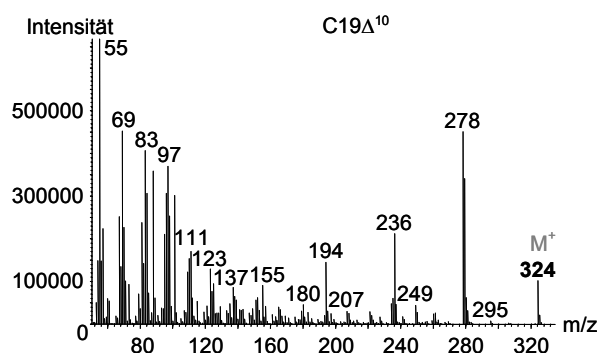
f) Massenspektren der einfach ungesättigten FSEE mit 18 + 2 C-Atomen



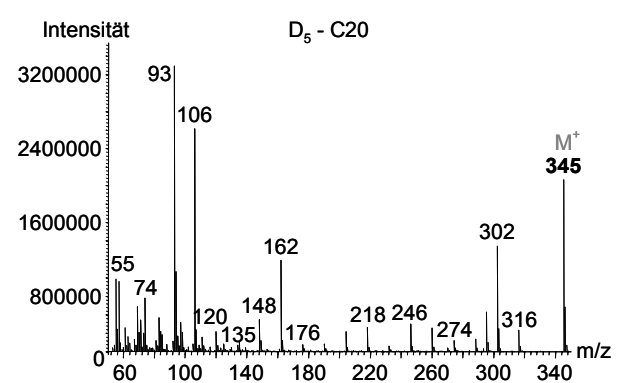
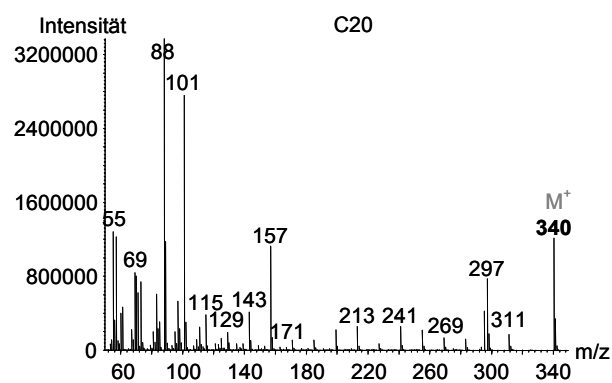
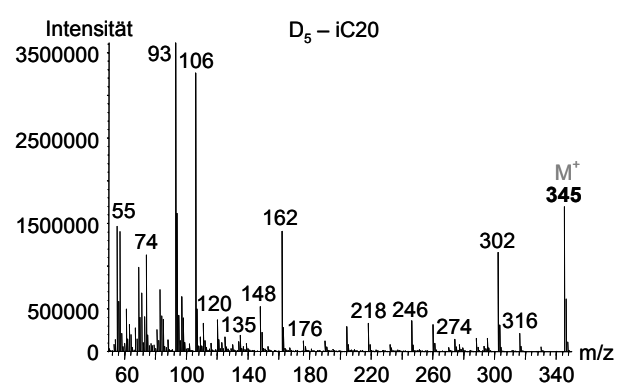
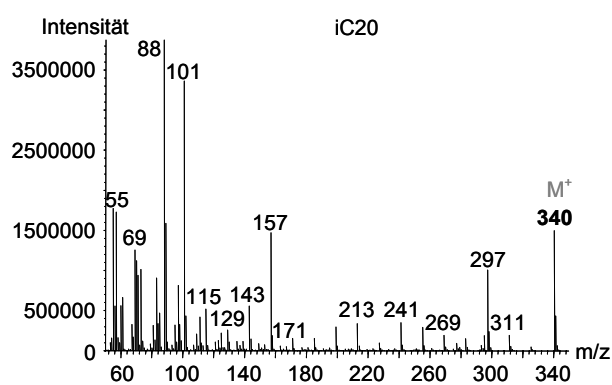
g) Massenspektren der mehrfach ungesättigten FSEE mit 18 + 2 C-Atomen



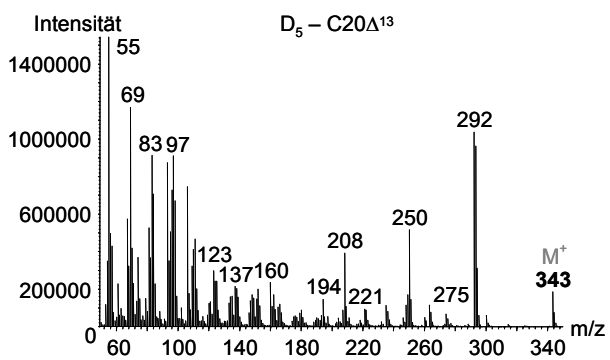
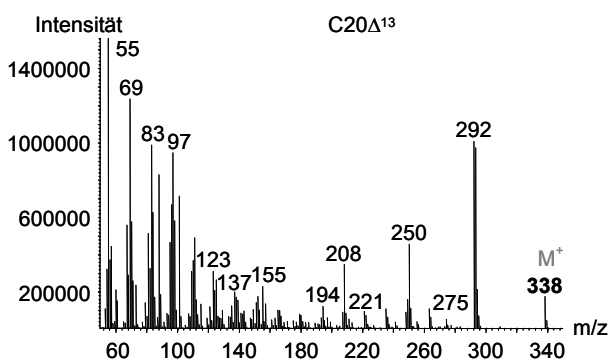
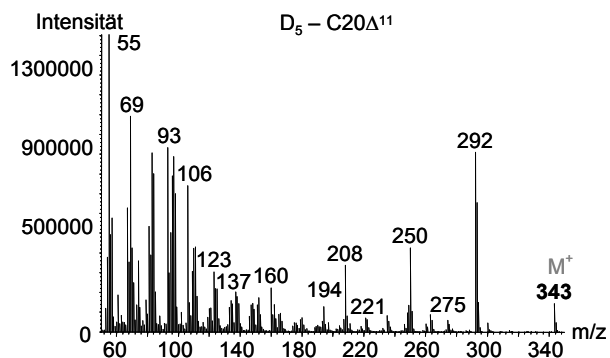
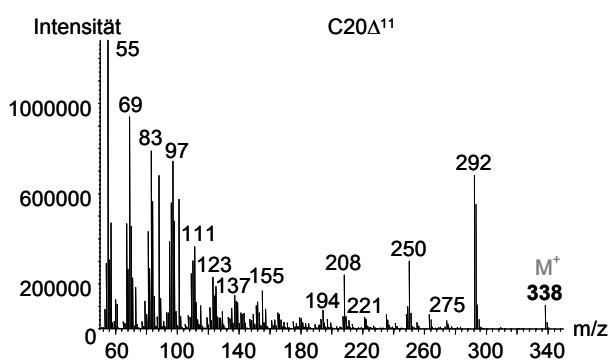
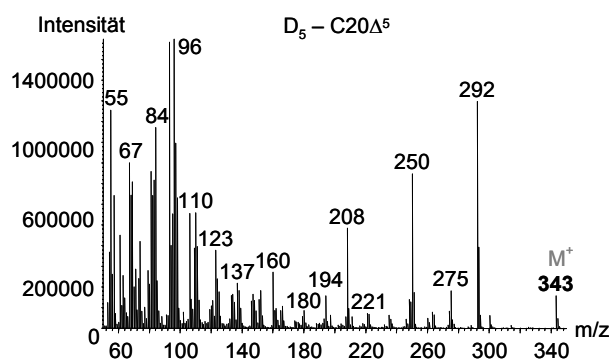
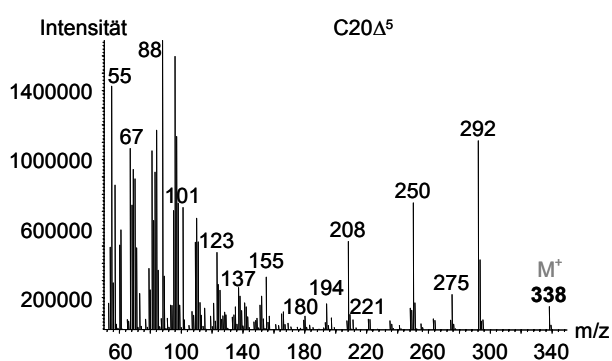
h) Massenspektren der FSEE mit 19 + 2 C-Atomen



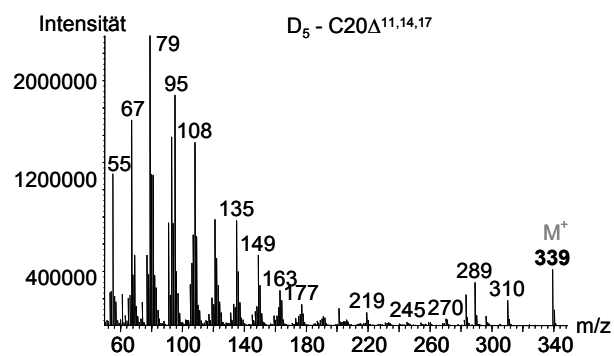
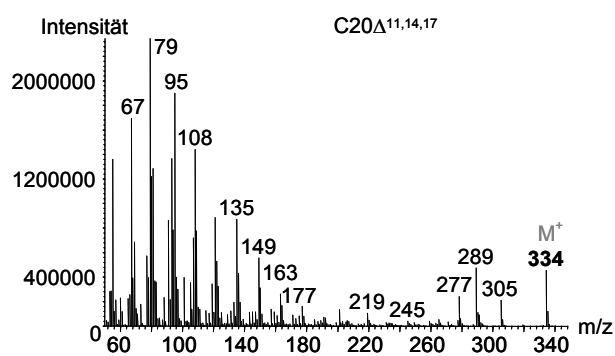
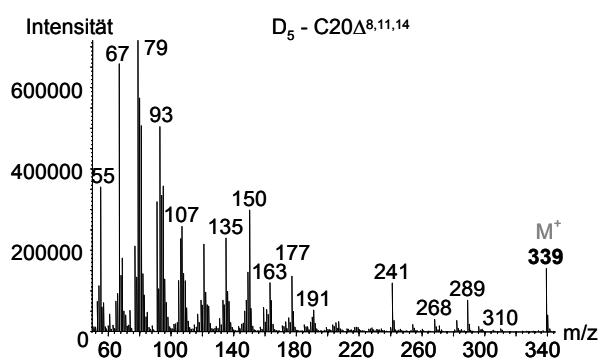
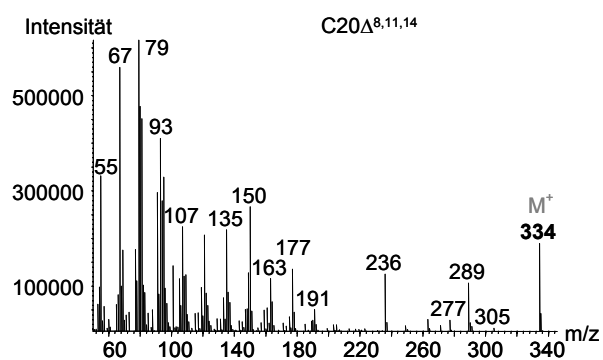
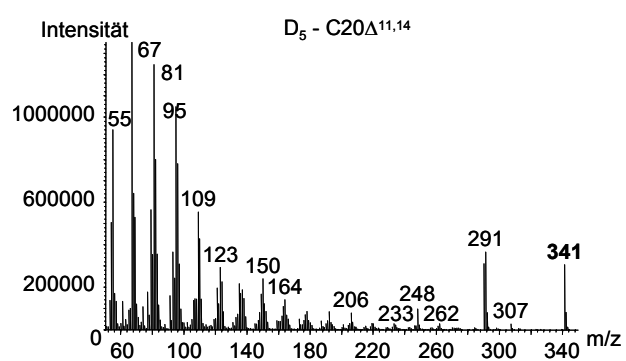
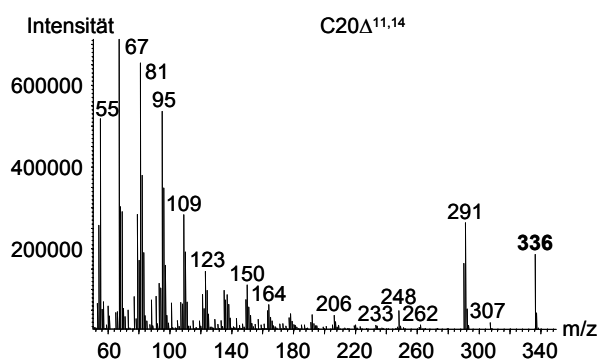
i) Massenspektren der gesättigten FSEE mit 20 + 2 C-Atomen



j) Massenspektren der einfach ungesättigten FSEE mit 20 + 2 C-Atomen



k) Massenspektren der mehrfach ungesättigten FSEE mit 20 + 2 C-Atomen



Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 27. Mai 1970 in Bad Wimpfen (Baden-Württemberg), verheiratet, 2 Kinder (geb. 1997 und 2001)

Schulausbildung

1976 bis 1980 Grundschule in Bad Wimpfen
1980 bis 1989 Hohenstaufen-Gymnasium Bad Wimpfen,
Abschluss: Abitur, Notendurchschnitt: 1,8
Leistungskurse: Chemie und Mathematik

Studium

1989/90 *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*
Ein Semester Studium der Anglistik und Chemie (Lehramt)
1990 bis 1992 *Universität Karlsruhe*
Chemiestudium (Grundstudium)
Vordiplomsnote: „gut“
1992 bis 2000 *Freie Universität Berlin*
Chemiestudium (Hauptstudium)
Vertiefungsfach: Physikalische Chemie, Wahlpflichtfach: Mathematik
Abschluss: „Diplomchemiker“, Gesamtnote: „sehr gut“
Diplomarbeit im Institut für Rechtsmedizin der Charité, Abteilung Toxikologische Chemie
1994 bis 1996 Mathematikstudium (Grundstudium)

Berufstätigkeit

10/00 bis 12/04 *Institut für Rechtsmedizin der Charité*
Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Toxikologische Chemie, Vorbereitung der Promotion
seit 01/2005 Freier Mitarbeiter am Institut für Rechtsmedizin der Charité

Sonstiges

01/04 bis 06/04 Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Charité

Berlin, 25.07.2005

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und unter ausschließlicher Benutzung der angegebenen Mittel und Methoden angefertigt habe.

Berlin, 25. Juli 2005